

El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas

The Genus *Aspergillus* and their Mycotoxins in Maize in Mexico: Problems and Perspectives

Hadassa Yuf Martínez Padrón, Sanjuana Hernández Delgado, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, CP 88710, México; **César Augusto Reyes Méndez y Gricelda Vázquez Carrillo**, Campos Experimentales Río Bravo y Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Correspondencia: hadassayuf@gmail.com

(Recibido: Junio 18, 2012 Aceptado: Diciembre 19, 2013)

Martínez Padrón HY, Hernández Delgado S, Reyes Méndez CA y Vázquez Carrillo G. 2013. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 126-146.

Resumen. El maíz es el cultivo más importante de México de acuerdo con la superficie cultivada anualmente y su consumo per cápita. Las pérdidas en la producción del grano se asocian con su manipulación durante la cosecha en el campo, almacenaje, transporte y procesamiento para el consumo humano o animal. El grano de maíz posee una microbiota particular de bacterias, insectos y hongos que pueden causarle daños. Entre ellos, el género fúngico *Aspergillus* y, de éste, las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* son las más importantes porque producen aflatoxinas que provocan gran variedad de efectos tóxicos en seres vivos expuestos al grano contaminado. Actualmente, las regulaciones mexicanas establecen límites permisibles sólo para aflatoxinas en cereales y sus productos, excluyendo otras micotoxinas. Las condiciones de producción de maíz en climas tropicales y subtropicales, particularmente en el noreste de México, favorecen las infecciones por hongos toxígenos. Por ello, es necesario la identificación e implementación de estrategias que reduzcan la contaminación en el grano. Entre ellas, destacan el uso de híbridos de maíz con resistencia a sequía, plagas, enfermedades y altos rendimientos de grano (H-436, 437, 439, 443A); manejo integrado de insectos y hongos mediante tratamiento químico, cultural o biológico y la modificación del procesamiento del grano para consumo humano (nixtamalización). Dichas medidas, individualmente o en conjunto, reducirán paulatinamente los daños causados por hongos potencialmente toxígenos en la planta de maíz y el consumidor final en México. En este trabajo presentamos una perspectiva de la investigación

Abstract. Maize is the major crop in Mexico according to the annually cultivated area and its per capita consumption. The losses on grain production are associated with handling during field harvest, storage, transportation, and processing for either human or animal consumption. The maize grain has particular pests associated such as bacteria, insects and fungi that can cause damage. Among them, the fungal genus *Aspergillus* and particularly species *A. flavus* and *A. parasiticus* are outstanding due to their production of aflatoxins which cause a broad variety of toxic effects on living organisms exposed to contaminated grains. Currently, Mexican regulations establish maximum limits of aflatoxins in cereal products, but other mycotoxins are excluded. The production conditions for maize in tropical and subtropical environments, particularly in northeastern Mexico, favor infections by toxigenic fungi. Therefore, it is necessary to identify and implement strategies that can reduce grain fungal contamination. Among them, outstand the use of maize hybrids with resistance to drought, pests, diseases, and high grain yield (H-436, 437, 439, 443A); integrated management of insects and fungi by chemical, cultural and/or biological treatment; and modifications of grain processing for human consumption ('flour-making'). Such measures will individual or together gradually reduce damage caused by potentially toxigenic fungi to the maize plant and ultimately to the consumer in Mexico. Here, we present an overview of current research about aflatoxigenic fungi in maize in Mexico, their implications on both human and cattle health, the tools (phytopathology, genetics of both the host and the pathogen, biochemistry, among others) to study this problem as well as those strategies for integrated management in order to date and to weight all data published until now, and then, establish essential points for further research.

Additional keywords: Aflatoxins, Integrated Pest Management Strategies, Aflatoxigenic fungi, *Zea mays* L.

actual en el tema de los hongos aflatoxigénicos en maíz con énfasis en México, sus implicaciones en salud humana y del ganado, las herramientas (fitopatológicas, genéticas del hospedante y el patógeno, bioquímicas, entre otras) de estudio del problema, así como las estrategias de manejo integrado utilizadas, para actualizar y ponderar la información generada a la fecha, y establecer puntos esenciales para futuras investigaciones.

Palabras clave adicionales: Aflatoxinas, Estrategias de Manejo Integrado, Hongos Aflatoxigénicos, *Zea mays* L.

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta nativa de México que actualmente se destina para la alimentación humana y del ganado, además de su aprovechamiento industrial. El consumo per cápita de maíz es de aproximadamente 160 g por día en forma de tortillas, principalmente (ASERCA, 2012). En el 2012 se produjeron en México más de 22 millones de toneladas de maíz (SIAP, 2014). Sin embargo, los volúmenes y la calidad de la producción de maíz en nuestro país son limitados debido principalmente a la incidencia de plagas y enfermedades, y por factores abióticos como altas y bajas temperaturas, la salinidad de los suelos, la deficiencia de nutrientes en los suelos y la sequía (Moreno y González, 2011).

Los hongos que comúnmente atacan al maíz tanto en campo como en almacén pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*; estos organismos son productores potenciales de micotoxinas (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el ambiente. La interacción de dichos factores determina la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y la cantidad de las aflatoxinas producidas (García y Heredia, 2006).

La producción de aflatoxinas es favorecida tanto por factores que ocurren en campo como en almacén (Devreese *et al.*, 2013). En campo, la producción de aflatoxinas se incrementa con el estrés hídrico, las altas temperaturas y los daños a la planta hospedante producidos por insectos de la mazorca pertenecientes a los géneros *Heliothis* y *Spodoptera* (Rodríguez *et al.*, 2010; Kebede *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior, la incidencia de aflatoxinas se ve favorecida por el ataque de plagas insectiles que se desarrollan bajo condiciones específicas como la fecha de siembra, altas densidades de siembra y alta incidencia de malezas (Rodríguez, 1996). En almacén, las condiciones de alta temperatura y humedad, aireación e inóculo primario proveniente del campo también son determinantes en el incremento de la síntesis de aflatoxinas en el grano de maíz (Hernández *et al.*, 2007).

En este trabajo se presenta una revisión respecto al estudio de la contaminación con aflatoxinas en el cultivo de maíz, sus implicaciones en salud humana y animal, estrategias de control y de manejo integrado, con el objetivo de actualizar y ponderar la información generada a la fecha, que marque la pauta en la búsqueda de soluciones para disminuir la incidencia y prevalencia de las aflatoxinas en

Maize (*Zea mays* L.) is a Mexican native plant currently intended for human and livestock consumption, besides its industrial use. Maize consumption per capita is about 160 g per day primarily in the form of tortillas, (ASERCA, 2012). In 2012, over 22 million tons of corn were produced in Mexico (SIAP, 2014). However, the volume and quality of maize production in our country is limited mainly due to the incidence of pests and diseases, and abiotic factors such as high or low temperatures, soil salinity, nutrient deficiency in soils and drought (Moreno and González, 2011).

The fungi that commonly attack stored corn and in the field, belong to the genus *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*; these organisms are potential producers of mycotoxins (Hernandez *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). *Aspergillus* growth and contamination of food products with aflatoxins are the result of the interaction between the fungus, the host and the environment. The interaction of such factors determines the infestation and colonization of the substrate, as well as the type and amount of aflatoxins produced (Garcia and Heredia, 2006).

Aflatoxin production is favored by factors that occur both in the field and during storage (Devreese *et al.*, 2013). In the field, aflatoxin production increases with water stress, high temperatures and damage to the host plant by cob insects belonging to the genera *Heliothis* and *Spodoptera* (Rodríguez *et al.*, 2010; Kebede *et al.*, 2012). Besides, the incidence of aflatoxin is favored by the attack of insect pests that develop under specific conditions such as planting date, high densities and high incidence of weeds (Rodríguez, 1996). During storage, the conditions of high temperature and humidity, ventilation and primary inoculum from the field are also crucial in increasing the synthesis of aflatoxin in maize grain (Hernández *et al.*, 2007).

In this paper, a review on the study of aflatoxin contamination in maize, its implications for human and animal health, control strategies and integrated management are presented, in order to update and weigh the information generated up to date, that set the guidelines in the search for solutions, to reduce the incidence and prevalence of aflatoxin in such crop, particularly in the case of Mexico, where maize is of very high importance from the ecological, economic, social and cultural point of view.

***Aspergillus* section Flavi.** Most species of the genus *Aspergillus* are saprophytes filamentous fungi that play an essential role in the degradation of organic matter. Their natural habitat is the soil where they survive and develop on decaying matter. This genus is one of the most abundant in nature and can be found in any environment; they reproduce by conidia whose germination originates hyphae. For growth, *Aspergillus* requires a relative humidity between 70- 90 %, water content in seeds between 15- 20 %, and a wide temperature range (0 to 45 °C) (Klich, 2002).

One of the peculiarities of *Aspergillus* species is their ability to produce mycotoxins, in this case, aflatoxins (AF). The basic structure of aflatoxins consists of a dihydrodiferan or tetrahydro- difuran ring attached to a coumarin with a ring of five or six carbon atoms. The difuranocoumarin cyclopentanones of AF of series B, M, P and Q are AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFM_{2a}, AFQ₁,

dicho cultivo particularmente para el caso de México, donde el cultivo del maíz es de importancia capital desde los puntos de vista ecológico, económico, social y cultural.

Aspergillus sección Flavi. La mayoría de las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente; se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas. Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90 %, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20 % y un rango de temperatura amplio (0 a 45 °C) (Klich, 2002).

Una de las particularidades de las especies de *Aspergillus* es su capacidad para producir micotoxinas, en este caso, aflatoxinas (AF). La estructura básica de las aflatoxinas consiste en un anillo dihidro-difurano o tetrahidro-difurano unido a una cumarina con un anillo de cinco o seis átomos de carbono. Las difuranocumarinas ciclopentanonas de AF de las series B, M, P y Q son las AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFM_{2a}, AFQ₁, AFP₁ y AFL. El segundo subgrupo corresponde a las lactonas difuranocumarinas de la serie G como son AFG₁, AFG₂, AFG_{2a}. Hay alrededor de 20 diferentes tipos de AF, las más importantes por su alto potencial cancerígeno, mutágeno y teratógeno son: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), P₁ (AFP₁), Q₁ (AFQ₁) y D (AFD), éste último derivado del tratamiento de la AFB₁ con amonio. Otro metabolito muy tóxico de la AFB₁ es el aflatoxicol (AFL). Sólo las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ se sintetizan naturalmente de la AFB₁; las otras AF (M₁, M₂, P₁, Q₁, G_{2a}, B_{2a} y AFL) son hidroxilados producto del metabolismo animal o microbiano. La AFB₁ es la más peligrosa y tóxica de todas (Carvajal, 2013) y es producida por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las aflatoxinas G₁ y G₂ se producen por *A. parasiticus* y *A. nomius*, exclusivamente; aunque Novas y Cabral (2002) reportaron la producción de AFG₁ en algunas cepas Africanas y Argentinas de *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*. Las especies *A. flavus*, *A. pseudotamarii* y algunas cepas de *A. caelatus* producen AFB₁ y AFB₂ (Peterson *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). AFB₂ y AFG₂ son inactivas biológicamente, pero se activan *in vivo* por oxidación a AFB₁ y AFG₁. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son formas hidroxiladas de AFB₁ y AFB₂ respectivamente; mientras que AFB_{2a} y AFG_{2a} son productos 8- y 9-hidratados de B₁ y G_{1,4} (Moudgil *et al.*, 2013). La AFB₁ exhibe toxicidad aguda, seguida de AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Madrigal *et al.*, 2011; Mejía *et al.*, 2011). Algunos precursores de aflatoxinas son hidroxiantraquinonas tales como el ácido norsolorínico, averufina, versicolorina A y averantina (Moudgil *et al.*, 2013).

Cabe notar que la capacidad de síntesis de aflatoxinas es característica de la cepa, no de la especie. Otra toxina producida por *A. flavus* es el ácido ciclopiazónico, que no ha aflatoxinas (Abbas *et al.*, 2011a). Hongos del género *Aspergillus* también inhiben la germinación de la semilla y producen cambios de color, temperatura (calentamiento),

AFP₁ and AFL. The second subgroup corresponds to difuranocoumarin lactones of G series such as AFG₁, AFG₂ and AFG_{2a}. There are about 20 different types of AF, among the most important for their high carcinogenic, mutagenic and teratogenic potentials are: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), P₁ (AFP₁), Q₁ (AFQ₁) and D (AFD); the latter is derived from AFB₁ treatment with ammonia. Another very toxic AFB₁ metabolite is aflatoxicol (AFL). Only AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ are synthesized naturally from AFB₁; the other AF (M₁, M₂, P₁, Q₁, G_{2a}, B_{2a} and AFL) are hydroxylated products from animal or microbial metabolism. AFB₁ is the most dangerous and toxic of all (Carvajal, 2013) and is produced by *A. flavus* and *A. parasiticus*. G₁ and G₂ aflatoxins are produced by *A. parasiticus* and *A. nomius*, exclusively; although Novas and Cabral (2002) reported the AFG₁ production in some African and Argentinean strains of *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*. The *A. flavus* and *A. pseudotamarii* species as well as some *A. caelatus* strains produce AFB₁ and AFB₂ (Peterson *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). AFB₂ and AFG₂ are biologically inactive but activate *in vivo* by AFB₁ and AFG₁ oxidation. M₁ and M₂ aflatoxins are hydroxylated forms of AFB₁ and AFB₂, respectively; while AFB_{2a} y AFG_{2a} are 8- and 9- hydrated products of B₁ and G_{1,4} (Moudgil *et al.*, 2013). AFB₁ exhibits acute toxicity, followed by AFB₂, AFG₁ and AFG₂ (Madrigal *et al.*, 2011; Mejía *et al.*, 2011). Some aflatoxins precursors are hydroxyanthraquinones such as norsolorinic acid, averufin, versicolorin A and averantin (Moudgil *et al.*, 2013).

It is important to mention that the ability to synthesize aflatoxins is characteristic of the strain, and not of the species. Another toxin produced by *A. flavus* is the cyclopiazonic acid, which has not been sufficiently studied as in the case of aflatoxins (Abbas *et al.*, 2011a). Fungi of the *Aspergillus* genus also inhibit seed germination and produce changes in color, temperature (warming), mildew, 'caking' and rotting. In contrast, species such as *A. niger* and *A. oryzae* are industrially relevant and they are used in food fermentations (Kozakiewicz, 1989; Klich, 2002).

The aflatoxin-producing species that causes higher contamination is *A. flavus* which contains L and S morphotypes. Cotty (1989) indicated that L isolates do not produce or produce very few sclerotia (with a diameter higher than 400 µm) and large amounts of conidia; meanwhile, the S strains produce numerous sclerotia (with a diameter less than <400 µm) and few conidia. Aflatoxins production in L isolates is very variable with some highly toxigenic and some non-toxic isolates, while S isolates produce high and consistent levels of aflatoxins (up to 10,000 µg/kg) (Probst *et al.*, 2010). There is a recent Kenyan report of high incidence of morphotype S causing problems of high incidence of G aflatoxins in maize grown in that country. However, phylogenetic analysis of African (Kenya, Nigeria), American (USA, Argentina), Australian and Asian (Philippines, Thailand) strains, indicated that African strains are genetically closer to the new species named *A. minisclerotigenes*, compared to *A. flavus* strains, and also that they produce exclusively aflatoxins B due to the occurrence of a deletion in the crypA gene (Probst *et al.*,

enmohecimiento, ‘apelmazamiento’ y pudrición pudrición. En contraste, especies como *A. niger* y *A. oryzae* son de interés industrial y se utilizan en la fermentación de alimentos (Kozakiewicz, 1989; Klich, 2002).

La especie productora de aflatoxinas que causa mayores contaminaciones es *A. flavus*, dentro de la cual se han definido dos morfotipos, denominados L y S. Cotty (1989) indicó que los aislamientos L no producen o producen pocos esclerocios mayores a 400 µm y grandes cantidades de conidios; por su parte las cepas S producen numerosos esclerocios con un diámetro menor a 400 µm y pocos conidios. La producción de aflatoxinas en aislamientos L es muy variable con algunos aislamientos altamente toxígenos y otros atoxigénicos, mientras que los aislamientos S producen altas y consistentes concentraciones de aflatoxinas (hasta 10,000 µg/kg) (Probst *et al.*, 2010). En Kenia se reportó recientemente alta incidencia del morfotipo S ocasionando problemas de alta incidencia de aflatoxinas G en maíz cultivado en dicho país. Sin embargo, el análisis filogenético de cepas Africanas (Kenia, Nigeria), así como de América (EUA, Argentina), Australia y Asia (Filipinas, Tailandia) indicó que las cepas Africanas son genéticamente más cercanas a la nueva especie nombrada como *A. minisclerotigenes* en comparación con cepas de *A. flavus* y, además, producen exclusivamente aflatoxinas B debido a la ocurrencia de una delección en el gen *crypA* (Probst *et al.*, 2012).

En 2005 se liberó la secuencia del genoma de *A. flavus* por el Instituto de Investigación Genómica de Estados Unidos y en 2010 se actualizó dicha secuencia (Cleveland *et al.*, 2009; Payne y Yu, 2010). Posteriormente, se generaron 7218 etiquetas de secuencia expresada (ESTs) únicas de *A. flavus*. El tamaño del genoma de *A. flavus* y de *A. oryzae* es de cerca de 37 Mb distribuidos en ocho cromosomas y que codifican para más de 12 mil genes funcionales (Chang y Ehrlich, 2010; Payne y Yu, 2010). El genoma de *A. flavus* es ligeramente mayor que el de *A. fumigatus* (aproximadamente 30 Mb), *A. terreus* (30 Mb), *A. niger* (34 Mb) y *A. nidulans* (31 Mb). A pesar de esta variación en los tamaños de los genomas, todas las especies de *Aspergillus* tienen ocho cromosomas. Un aspecto importante es que *A. flavus* y *A. oryzae* tienen copias extra de genes específicos al linaje. Esas extracopias se localizan por lo general en bloques no sinténicos. Aunque no se han secuenciado sus genomas, con base en estudios cariotípicos se ha sugerido similitud en el tamaño del genoma de *A. parasiticus* y *A. sojae* con respecto a *A. flavus* (Amaike y Keller, 2011).

Producción de aflatoxinas. A pesar de que México es el centro de origen y de diversidad del maíz (Ortega, 2003), dicha diversidad no se ha analizado exhaustiva o consistentemente para identificar genotipos más tolerantes a la contaminación por aflatoxinas. Dado que el maíz es un alimento de importancia mundial, es necesario el monitoreo de la calidad sanitaria, desde el uso de semillas libres de patógenos durante cada una de las etapas del cultivo, hasta la cosecha, e incluso, durante la pos-cosecha (Plasencia, 2004). Es importante señalar que en México la mayor proporción del maíz se cultiva en condiciones de temporal (60 %) (SIAP, 2014) que, en general, es deficiente y errático

2012).

In 2005, the Institute for Genomic Research in the U.S. released the genome sequence of *A. flavus*, and in 2010 this sequence was updated (Cleveland *et al.*, 2009; Payne and Yu, 2010). Later on, 7218 expressed sequence tags (ESTs) unique to *A. flavus* were generated. The genome size of *A. flavus* and *A. oryzae* is about 37 Mb distributed in eight chromosomes and that encode more than 12 thousand functional genes (Chang y Ehrlich, 2010; Payne and Yu, 2010). *A. flavus* genome is slightly larger than that of *A. fumigatus* (about 30 Mb), *A. terreus* (30 Mb), *A. niger* (34 Mb) and *A. nidulans* (31 Mb). Despite this variation in the genome size, all *Aspergillus* species contain eight chromosomes. An important aspect is that *A. flavus* and *A. oryzae* have extra copies of lineage-specific genes. These extra copies are located, usually, in non-syntenic blocks. Although their genomes have not been sequenced, based on karyotypic studies, it has been suggested similarity in genome size of *A. parasiticus* and *A. sojae* with respect to *A. flavus* (Amaike and Keller, 2011).

Aflatoxins production. Although Mexico is the center of origin and diversity of maize (Ortega, 2003), this diversity has not been thorough or consistently used to identify more tolerant genotypes to aflatoxins contamination. Since maize is a worldwide important food, it is necessary the monitoring of its sanitary quality, from the use of pathogen-free seeds during each stage of the crop till harvest, and even during the post-harvest (Plasencia, 2004). It is important to note that in Mexico the largest proportion of maize is grown under rain fed conditions (60 %) (SIAP, 2014) that, in general, is poor and erratic and often it results in the coincidence of water stress and high temperatures during reproductive phenological phase, which ultimately favors *Aspergillus* infection in the field (Rodríguez, 1996; Cotty y Jaime-García, 2007).

The toxigenic effects of aflatoxins produced by *Aspergillus* ranges from carcinogenic, teratogenic or mutagenic to the production of hormonal or immunosuppressive disorders; which in turn depends on aflatoxin, dose, exposure time or exposed organism (Carvajal, 2013). The main problem is that aflatoxins are cumulative so that once grain, agricultural product in the field or stored grain are contaminated, they survive to digestion, the heat of cooking or freezing temperatures. Aflatoxins are ingested by humans not only through grains, seeds or fruits, they are also present in milk or meat from animals raised on contaminated food (Requena *et al.*, 2005).

In Mexico, most studies have been limited to record *Aspergillus* incidence, aflatoxins quantification, as well as the identification to the genus level, of the fungi present in the maize grain (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). Particularly in the northern state of Tamaulipas, one of the most important maize growing areas in Mexico, more than 230,000 ha per year are cultivated, and in the last decade about 100,000 ha of maize are sown annually (Reyes and Cantu, 2006). In that same region, *Aspergillus* incidence is common, and sometimes so intense, that has led to rethink the technology of maize cultivation in the region, based on the development or adaptation of management strategies

y que frecuentemente redundan en la coincidencia de estrés hídrico y altas temperaturas durante la fase fenológica reproductiva, lo que finalmente favorece la infección de *Aspergillus* en campo (Rodríguez, 1996; Cotty y Jaime-García, 2007).

El efecto toxígeno de las aflatoxinas producidas por *Aspergillus* varía desde los carcinogénicos, teratogénicos o mutagénicos hasta la producción de desórdenes hormonales o inmunosupresores; lo que a su vez depende de la aflatoxina, dosis, tiempo de exposición u organismo expuesto (Carvajal, 2013). El problema principal reside en que las aflatoxinas son acumulativas de modo que una vez que contaminan el grano o el producto agrícola en campo o almacén persisten a la digestión, al calor de la cocción o al congelamiento. Las aflatoxinas son ingeridas por los seres humanos no sólo a través de granos, semillas o frutos; también se presentan en la leche o la carne de animales criados con alimentos contaminados (Requena *et al.*, 2005).

En México la mayoría de los estudios se han limitado a registrar la incidencia de *Aspergillus* y la cuantificación de las aflatoxinas, así como la identificación a nivel de género de los hongos presentes en el grano de maíz (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). Particularmente en el norte del estado de Tamaulipas, una de las zonas maiceras más importantes de México, se llegaron a cultivar más de 230 mil ha al año y en la última década en promedio se siembran anualmente unas 100 mil ha con maíz (Reyes y Cantú, 2006). En esa región, la incidencia de *Aspergillus* es frecuente y en ocasiones de tal intensidad que ha llevado a replantear la tecnología del cultivo del maíz en la región basada en el desarrollo o la adecuación de estrategias para su manejo (Reyes y Cantú, 2006; Díaz-Franco y Montes-García, 2008). El género *Aspergillus* ocurre con mayor frecuencia en maíz almacenado para consumo, mientras que en campo la mayor incidencia la presenta *Fusarium* (Hernández *et al.*, 2007). Por su parte, Montes *et al.* (2009) identificaron a *A. flavus* y *A. niger* en híbridos con grano blanco o amarillo, donde éstos últimos exhibieron mayores porcentajes de infección. Alvarado *et al.* (2010) detectaron alta concentración de aflatoxinas en siembras con una alta densidad de población de maíz (siembra en camas y concentraciones de 20.8 µg/kg); sin embargo, el riego por goteo redujo casi a la mitad las infecciones por *A. flavus* (concentraciones de aflatoxinas de 11.1 µg/kg). En la ciudad de Monterrey se analizaron muestras de maíz tomadas de diferentes puntos de distribución y se detectó a AFB₁ en un rango de 5.03 a 465.31 ng/g y AFG₁ en concentraciones de 1.59 a 57.1 ng/g. De las 41 muestras analizadas, 87.8 % estaban contaminadas con aflatoxinas y 58.5 % contenía niveles por encima de los límites legales permitidos en México (Torres *et al.*, 1995). Por su parte, Bucio *et al.* (2001) analizaron maíz almacenado en Guanajuato y concluyeron que la contaminación por aflatoxinas no se asocia con las condiciones del cultivo sino con las condiciones inadecuadas de almacenamiento del grano. En el estado de Sonora, México, de 66 muestras de maíz almacenadas siete registraron concentraciones de AFB₁ menores a las permitidas la NOM 247-SSA1-2008 (Ochoa *et al.*, 1989) y en 111 muestras de 'pozol' de mercados locales de Chiapas se

(Reyes and Cantú, 2006; Díaz-Franco y Montes-García, 2008). *Aspergillus* genus occurs more frequently in stored corn for consumption, while the highest incidence in the field is *Fusarium* (Hernández *et al.*, 2007). Meanwhile, Montes *et al.* (2009) identified *A. flavus* and *A. niger* in hybrids with white or yellow corn, where the latter showed higher rates of infection. Alvarado *et al.* (2010) detected high aflatoxins concentrations in crops with a high maize population density (planting in beds and 20.8 µg/kg concentration); however, drip irrigation reduced by almost half the *A. flavus* infections (11.1 µg/kg aflatoxin concentration). In Monterrey, maize samples collected from different distribution centers were analyzed; AFB₁ was detected in concentrations ranging from 5.03 to 465.31 ng/g and AFG₁ from 1.59 a 57.1 ng/g. From the 41 samples analyzed, 87.8 % was contaminated with aflatoxins and 58.5 % contained levels above permitted legal limits in Mexico (Torres *et al.*, 1995). Meanwhile, Bucio *et al.* (2001) analyzed stored corn in Guanajuato and they concluded that aflatoxins contamination is not related to crop conditions, but to inadequate grain storage conditions. In Sonora state, Mexico, from 66 samples of stored corn, 7 of them had AFB₁ concentrations lower than those permitted by Mexican norm NOM 247-SSA1-2008 (Ochoa *et al.*, 1989) and in 111 samples of Chiapas local markets of 'pozol' maize grains, 19 samples with AFB₂ were detected with 0.5 to 21 µg/kg levels and AFB₁ traces (Méndez *et al.*, 2004). Despite the consistency of aflatoxins detection in vegetative or semi-processed corn samples, the concentrations are variable depending on sample origin, environmental or storage conditions, germplasm, etc. (Jaime-García y Cotty, 2010). However, it can't be denied that aflatoxin accumulation and their harmful effects on the end consumer, remain dormant (Carvajal, 2013).

Mode of action of aflatoxins. Biologically, aflatoxins behave as immunosuppressants that inhibit phagocytosis and protein synthesis, and they disrupt formation of DNA, RNA and proteins in the ribosome (Carvajal, 2013). For this reason, the International Agency for Research on Cancer, (IARC, 2013), in 1988 classified aflatoxins in the group 1 of mycotoxins which includes substances or mixtures with high carcinogenic potential in humans.

When food contaminated with B₁ aflatoxin is ingested, it is first absorbed in the small intestine, and then, it is transported to the blood, where the red blood cells and plasma proteins carry it to the liver. In the liver cells, the toxin is metabolized in the endoplasmic reticulum and it transforms into the P₁, M₁, Q₁ aflatoxins because the molecule hydroxylates. During such chemical reaction, the toxin B1-8,9-epoxide is formed, and it can be detoxified by a transferase forming a conjugate with glutathione in the thiol form (GSH). Aflatoxins are mutagenic because their structure is related to nucleic acids and proteins and binds to them via covalent bonds. These bonds cause disruptions in the transcription and translation and they generate the formation of a DNA adduct known as B₁-guanine aflatoxin and lipid peroxidation. For this reason, aflatoxins at the cellular level, cause inhibition of DNA, RNA, mitosis and

detectaron 19 muestras con AFB₂ con niveles de 0.5 a 21 µg/kg, así como trazas de AFB₁ (Méndez *et al.*, 2004). A pesar de la consistencia en la detección de aflatoxinas en muestras vegetales o semi-procesadas de maíz, las concentraciones son variables dependiendo del origen de la muestra, condiciones de almacenamiento o ambientales, germoplasma, etc. (Jaime-García y Cotty, 2010). No obstante, no se puede soslayar que la acumulación de aflatoxinas y sus efectos nocivos en el consumidor final permanecen latentes (Carvajal, 2013).

Modos de acción de las aflatoxinas.

Biológicamente, las aflatoxinas se comportan como inmunosupresores que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica e interrumpen la formación del DNA, RNA y las proteínas en el ribosoma (Carvajal, 2013). Por tal razón, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, IARC (2013) por sus siglas en inglés, en 1988 clasificó a las aflatoxinas en el grupo I de micotoxinas que incluye sustancias o mezclas de ellas con alto poder cancerígeno en humanos.

Cuando se ingiere un alimento contaminado con aflatoxina B₁, ésta primero se absorbe en el intestino delgado y luego es transportada en la sangre, donde los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas la conducen hacia el hígado. En las células hepáticas la toxina se metaboliza en el retículo endoplasmático para transformarse en las aflatoxinas P₁, M₁, Q₁ debido a que la molécula se hidroxila. En dicha reacción se forma paralelamente la toxina B1-8,9-epóxido que puede detoxificarse por una transferasa formando un conjugado con el glutatión en su forma tiólica (GSH). Las aflatoxinas son mutagénicas debido a que su estructura es afín a los ácidos nucleicos y proteínas y se une a ellos mediante enlaces covalentes. Estos enlaces ocasionan interrupciones en la transcripción y traducción y generan la formación de un aducto de DNA llamado aflatoxina B₁-guanina y peroxidación de lípidos. Por tal razón las aflatoxinas, a nivel celular, ocasionan la inhibición del DNA, RNA, mitosis, alteraciones cromosómicas, que a su vez redundan en efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos (Carvajal, 2013; Moudgil *et al.*, 2013).

Las aflatoxinas se sintetizan por la ruta metabólica de los policétidos mediante reacciones de condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, que permiten formar una molécula que consiste en un anillo cumarín unido a una unidad bis-dihidrofurano y a una ciclopentanona (Guzmán-de Peña, 2007; Carvajal, 2013). Guzmán-de Peña (2007) señala que las aflatoxinas se forman por la condensación de la acetil-coenzima A y la malonil-coenzima A, produciendo la acetil-S coenzima A, molécula iniciadora de la AFB₁. Dentro de la ruta biosintética, la formación de la versicolorina A es particularmente relevante, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB₁ y que contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la molécula del bis-furano. Este doble enlace es el blanco para la activación de una molécula altamente reactiva. Durante la síntesis ocurren al menos 23 reacciones enzimáticas y 15 intermediarios. A nivel molecular se ven involucrados 25 genes en los pasos de

chromosomal alterations, which in turn result in carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects (Carvajal, 2013; Moudgil *et al.*, 2013).

Aflatoxins are synthesized via polyketides metabolic pathway through condensation, oxidation, reduction, alkylation and halogenation reactions that allow to form a molecule consisting of a coumarin ring bonded to a bis-dihydrofuran unit and to a cyclopentanone (Guzmán de Peña, 2007; Carvajal, 2013). Guzmán de Peña (2007) reported that aflatoxins are formed by condensation of acetyl-coenzyme A and malonyl coenzyme A, producing S-acetyl coenzyme A, which is the AFB₁ initiator molecule. In the biosynthetic pathway, the versicolorine A formation is particularly relevant, because it is the first molecule in the AFB₁ pathway, and it has a double bond in the 8,9 position of the bis-furan molecule. This double bond is the target for the activation of a highly reactive molecule. During synthesis at least 23 enzymatic reactions and 15 intermediaries occur. At molecular level, 25 genes are involved in inter conversion steps, which have been sequenced, confirmed by gene disruption and enzymatic studies, and are clustered in a DNA region of 70 kb.

At molecular level, more than 25 genes clustered in a 70 kb region, encode the enzymes and regulatory proteins of the aflatoxin synthesis in *A. flavus* and *A. parasiticus*. Among them, *hexA*, *hexB* y *pksA* genes are larger than 5 kb and they encode the alpha subunit of fatty acid synthase (5.8 kb); beta subunit of same synthase (of 5.1 kb) and polyketide synthase (6.6 kb), respectively. In the meantime, the 22 genes involved have an average size of 2 kb. A region of approximately 2 kb with no open reading frame presumably determines the beginning of the cluster of genes (Ehrlich *et al.*, 2005; Amare y Keller, 2014).

Aflatoxin biosynthesis is affected by genetic and environmental factors. The *aflR* gene is positively regulated and it encodes a protein coupled to DNA with a "zinc fingers" specific sequence; such gene is necessary for transcription of most aflatoxin structural genes (Bhatnagar *et al.*, 2006). Then, the *aflJ* (or *aflS*) gene, adjacent to *aflR* is associated with the expression of *pksA*, *nor1*, *ver1* and *omtA* (Chang, 2003; Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna y Payne, 2009; Yu *et al.*, 2009; Amare y Keller, 2014). Moreover, the location on the chromosome and some global transcription factors mediated by nitrogen, carbon or pH regulated, also affect the expression of the aflatoxin structural genes. Nitrogen and carbon sources, pH, temperature, availability and activity of the water and plant metabolites, affect aflatoxins synthesis (Bhatnagar *et al.*, 2006) and they are directly associated to the corresponding metabolic pathways, because when the fungus is under stress due to heat or moisture, the aflatoxins are synthesized in small quantities; under favorable environmental factors, the synthesis and the expression profiles of the genes directly associated to such synthesis are increased, since the ratio of the expression *aflR/aflJ* correlates with the increase of aflatoxins biosynthesis (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009).

Recent microarray studies have shown that the *A. flavus* genome contains 56 secondary metabolic clusters (Georgianna *et al.*, 2010) besides a Kojic acid cluster

inter conversión, los cuales han sido secuenciados, confirmados por disrupción génica y por estudios enzimáticos y están agrupados en una región del DNA de 70 kb.

A nivel molecular, más de 25 genes conglomerados en una región de 70 kb codifican las enzimas y proteínas reguladoras de la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus*. Entre ellos, los genes *hexA*, *hexB* y *pksA* son mayores a 5 kb y codifican la subunidad alfa de la sintasa de ácidos grasos (de 5.8 kb); la subunidad beta de la misma sintasa (de 5.1kb) y la sintasa de poliquétidos (de 6.6 kb), respectivamente. Por su parte, los 22 genes involucrados tienen un tamaño promedio de 2 kb. Una región de aproximadamente 2 kb sin marco de lectura abierto identificable presumiblemente determina el inicio del conglomerado de genes (Ehrlich *et al.*, 2005; Amare y Keller, 2014).

La biosíntesis de las aflatoxinas es afectada por factores genéticos y ambientales. El gen *afIR* es positivamente regulado y codifica una proteína acoplada a DNA con secuencia específica de 'dedos de zinc'; dicho gen es requerido para la transcripción de la mayoría de los genes estructurales de aflatoxinas (Bhatnagar *et al.*, 2006). Luego, el gen regulador *afII* (o *afIS*), adyacente a *afIR*, se asocia con la expresión de *pksA*, *nor1*, *ver1* y *omtA* (Chang, 2003; Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna y Payne, 2009; Yu *et al.*, 2009; Amare y Keller, 2014). Adicionalmente, la ubicación en el cromosoma y algunos factores de transcripción global mediados por nitrógeno, carbono o regulados por pH también afectan la expresión de los genes estructurales de aflatoxinas. Las fuentes de nitrógeno y carbono, el pH, la temperatura, la disponibilidad y actividad del agua y metabolitos de las plantas afectan la síntesis de aflatoxinas (Bhatnagar *et al.*, 2006) y están directamente asociadas en las rutas metabólicas correspondientes, pues cuando el hongo se sujeta a condiciones de estrés por calor o humedad, las aflatoxinas se sintetizan pero en cantidades mínimas; bajo combinaciones favorables de ambos factores ambientales se incrementa la síntesis y los perfiles de expresión de los genes directamente asociados a dicha síntesis, dado que la relación de expresión entre *afIR/afII* se correlaciona con el incremento en la biosíntesis de las aflatoxinas (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009).

Recientes estudios con microarreglos revelan que el genoma de *A. flavus* contiene 56 conglomerados metabólicos secundarios (Georgianna *et al.*, 2010), además del conglomerado de ácido kójico (Marui *et al.*, 2011). Estudios bioinformáticos basados en el algoritmo para la detección *de novo* de motivos independientes (MIDDAS-M) permitieron identificar conglomerados adicionales a los reportados por Georgianna *et al.* (2010) (Umemura *et al.*, 2013). Del total de conglomerados, cuyo número completo aún se desconoce, al menos ocho se han caracterizado parcial o completamente, tales como el de los genes de biosíntesis de aflatoxinas, que se localiza entre los conglomerados de genes de utilización de azúcares y del ácido ciclopiazónico (Amare y Keller, 2014).

Por otra parte, la pérdida de toxicidad se basa en la presencia de mutaciones puntuales o deleciones en el

(Marui *et al.*, 2011). Bioinformatic studies based on the Motif-Independent *De Novo* Detection Algorithm (MIDDAS-M) allowed to identify additional clusters to those reported by Georgianna *et al.* (2010) (Umemura *et al.*, 2013). From total number of clusters, whose full number is still unknown, at least eight have been partially or completely characterized, such as that of the aflatoxin biosynthesis genes, which is located between the gene clusters of sugar utilization and the cyclopiazonic acid (Amare and Keller, 2014).

On the other hand, the loss of toxicity is based on the presence of specific mutations or deletions in the gene cluster described (Chang *et al.*, 2005). For example, in the AF36 atoxigenic strain there is a replacement of G for A at the nt591 site of the polyketide synthase gene, introducing a termination codon in the position 176 of the gene, stopping the enzymatic synthesis and aflatoxin accumulation (Ehrlich y Cotty, 2004). In turn, the NRRL21882 strain has a deletion in the complete gene cluster from the *hexA* coding region in the group of sugar utilization genes to the telomeric region (Chang *et al.*, 2005). Lastly, Criseo *et al.* (2008) observed non-toxicogenic *A. flavus* strains in the whole group of genes that have toxicogenic strains. In this case, atoxigenicity was explained due to defects at the molecular level such as post-translational or protein modifications, although there is no complete evidences about this.

Aflatoxins are low soluble in water, but very soluble in chloroform, methane, acetonitrile or acetone aqueous solutions, because crystals of aflatoxins do not have the same properties than natural aflatoxins. Furthermore, in pure state, they are light and air unstable as well as susceptible to alkaline hydrolysis; they are affected by ammonia or sodium hypochlorite (pH > 10.5), they are heat resistant and stable in a pH range between 3 and 10, odorless, colorless, tasteless and chemically stable in foods and resistant to degradation under normal cooking procedures and difficult to remove once they occur (Guzman-De Peña, 2007; Carvajal, 2013).

Implications in human and animal health.

Aflatoxins are mainly present in agricultural products as raw materials for livestock food preparation as contaminants, or as toxic waste of such animal exploitation like milk, eggs or meat (Requena *et al.*, 2005).

Aflatoxins incidence in humans and livestock food has been studied in several countries (Robledo *et al.*, 2001; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; Hong and Yusof, 2010; Nazari *et al.*, 2013; Stojanovska-Dimzoska *et al.*, 2013) and, in general, they are linked to the development of liver and lung cancer in humans (Liu and Wu, 2010; Wild and Gong, 2010; Carvajal, 2013; Aliabadi *et al.*, 2013; Magnussen and Parsi, 2013; Moudgil *et al.*, 2013). Liu and Wu (2010) analyzed between 550 and 600 thousand worldwide cases of patients with liver cancer mainly in sub-Saharan Africa, Southeast Asia and China, and they found that between 4.6 and 28.2 % of these cases are directly associated to aflatoxin over-exposure (25-155 thousand cases). In Mexico, research on the implications and effects of aflatoxins in humans became more important after the 90's because consumption of contaminated food with AFM₁ animal by milk-producers,

conglomerado de genes descrito (Chang *et al.*, 2005). Por ejemplo, la cepa atoxigénica AF36 muestra un reemplazo de G por A en el sitio nt591 del gen de sintasa de poliquétido, introduciendo un codón de terminación en la posición 176 del gen, deteniendo la síntesis enzimática y acumulación de aflatoxinas (Ehrlich y Cotty, 2004). A su vez, la cepa NRRL21882 presenta una delección en el conglomerado de genes completo desde la región codificadora de *hexA* en el grupo de genes de utilización de azúcares a la región telomérica (Chang *et al.*, 2005). Finalmente, Criseo *et al.* (2008) observaron cepas de *A. flavus* no toxigénicas con todo el grupo de genes que presentan las cepas toxigénicas. En este caso, la atoxigenicidad se explicó debido a defectos a nivel molecular como modificaciones post-transcripcionales o proteínicas, aunque aún no se tienen los elementos completos al respecto.

Las aflatoxinas exhiben baja solubilidad en agua, pero son solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metano, acetonitrilo o acetona, debido a que los cristales de aflatoxinas no tienen las mismas propiedades de la aflatoxinas naturales. Además, son relativamente inestables a la luz y al aire en estado puro y susceptibles a la hidrólisis alcalina; son afectadas por amoníaco o hipoclorito de sodio (pH>10.5); termo-resistentes y estables en un rango de pH entre 3 y 10; inodoras, incoloras e insípidas; así como químicamente, estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales y de difícil eliminación una vez que se producen (Guzmán-De Peña, 2007; Carvajal, 2013).

Implicaciones en salud humana y animal. Las aflatoxinas se encuentran principalmente en productos agrícolas como las materias primas para la preparación de alimentos balanceados para ganado en forma de contaminantes o bien, como residuos tóxicos de los productos de dicha explotación zootécnica como la leche, huevo o carne (Requena *et al.*, 2005).

La incidencia de las aflatoxinas en alimentos para humanos y para ganado se ha estudiado en diversos países (Robledo *et al.*, 2001; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; Hong y Yusof, 2010; Nazari *et al.*, 2013; Stojanovska-Dimzoska *et al.*, 2013) y, en general, se asocian con el desarrollo de cáncer de hígado y de pulmón en humanos (Liu y Wu, 2010; Wild y Gong, 2010; Carvajal, 2013; Aliabadi *et al.*, 2013; Magnussen y Parsi, 2013; Moudgil *et al.*, 2013). Liu y Wu (2010) analizaron entre 550 y 600 mil casos a nivel mundial de pacientes con cáncer de hígado principalmente reportados en África sub-Sahariana, Sureste Asiático y China, determinaron que entre 4.6 y 28.2 % de dichos casos se asocian directamente con la sobre-exposición a las aflatoxinas (25-155 mil casos). En México, la investigación de las implicaciones y efectos de las aflatoxinas cobró mayor importancia a partir de la década de 1990 debido a que el consumo de alimentos contaminados con AFM₁ por animales productores de leche representa un riesgo potencial a la salud pública, particularmente en la población infantil. En 40 hatos lecheros del estado de Jalisco se detectaron 92 % de raciones alimenticias contaminadas con aflatoxinas totales (entre 4.82 y 24.89 µg/kg) y el 80 % de leche cruda producida por los mismos estaban

poseen un potencial riesgo a la salud pública, particularmente la población infantil. En Jalisco, de 40 hatos lecheros, 92 % de las raciones de alimentos fueron encontradas contaminadas con aflatoxinas totales (entre 4.82 y 24.89 µg/kg), y el 80 % de la producción de leche cruda fue encontrada contaminada con M₁ aflatoxina (0.006 a 0.065 µg/L leche) (Reyes *et al.*, 2009). En México, de 35 muestras comerciales (perros y gatos) de 12 marcas diferentes, se detectaron siete aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ y P₁) con altas concentraciones en dos muestras (72.4 y 597 µg/kg alimento). La B₁ aflatoxina fue encontrada en el 100 % de las muestras de alimento de gato y el 79 % de las de alimento de perro. Muestras con mayores niveles de AFB₁ y AFM₁ utilizaron maíz como el ingrediente principal en sus formulaciones (Sharma y Márquez, 2001).

La asociación de mutaciones en el codón 249 del gen *p53* (Moudgil *et al.*, 2013) fue evaluada en células de carcinoma de hígado de pacientes en Monterrey, México, detectando antígenos de hepatitis B y/o C y la mutación, en 3 de 16 casos, del gen *p53* y concentraciones de 0.54 a 4.64 pmol de AFB₁-lisina/mg albúmina. Antígenos de hepatitis B y/o C fueron positivos en 12 de 20 casos. Bajo estas condiciones, incluso a niveles relativamente bajos de AFB₁, puede resultar en una situación de alto riesgo dada la exposición diaria (Soini *et al.*, 1996). Resultados similares a nivel molecular se reportan en pacientes de Senegal (Coursaget *et al.*, 1993), Estados Unidos, Tailandia y China (Aguilar *et al.*, 1994) y China (Jackson *et al.*, 2003). Carvajal *et al.* (2012) encontró una fuerte conexión entre aflatoxinas y tipos de virus del papilloma humano (HPV) 16 y 18 en cáncer cervical; también verificaron la presencia de tumores cancerosos (hígado, colon, pulmón y páncreas) y orina de pacientes con cirrosis viral, hepatitis B y C y concluyeron que las aflatoxinas actúan como cofactores que mejoran la incidencia de enfermedades en organismos.

Regulaciones sanitarias. México ha desarrollado normativas para regular la incidencia de aflatoxinas en cereales. En 2008, la norma mexicana NOM-247-SSA1-2008, fue publicada y establece que el nivel máximo permisible de aflatoxina en cereales es 20 µg/kg para el consumo humano y animal; además, proporciona especificaciones para el transporte y almacenamiento de cereales y especifica que el límite máximo para aflatoxina en maíz molido y tortilla de maíz es 12 µg/kg (NOM-247-SSA1-2008). Sin embargo, es importante señalar que no existen regulaciones similares para otros micotoxinas comúnmente encontradas en productos agrícolas como las fumonisinas o ocratoxinas (Li *et al.*, 2011), o para el más tóxico aflatoxina B₁ o M₁ en productos lácteos. Esto confirma que es esencial implementar estudios para generar conocimiento sobre estos micotoxinas con el fin de desarrollar y validar nuevas regulaciones para manejarlos, junto con la emisión de legislación regulatoria. Actualmente, límites han sido establecidos para aflatoxinas permISIBLES en los países importadores y exportadores de productos agrícolas en el mundo. Por ejemplo, en Estados Unidos 20 µg/kg es permitido en alimentos y 0.5 µg/kg de M₁ aflatoxina en leche (FDA-USA, 2012); en la Unión Europea, se permite un máximo de 20 µg/kg de B₁ aflatoxina (EU-EFSA, 2002).

contaminados con aflatoxina M_1 (de 0.006 a 0.065 $\mu\text{g/L}$ de leche) (Reyes *et al.*, 2009). En 35 muestras de alimento para perros y gatos de 12 marcas diferentes en México se detectaron siete aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 , M_2 y P_1) con concentraciones altas en dos muestras (72.4 y 597 $\mu\text{g/kg}$ de alimento). La aflatoxina B_1 se encontró en 100 % de las muestras de alimento para gatos y 79 % para perros. Las muestras con mayor cantidad de AFB_1 y AFM_1 utilizaban maíz como principal ingrediente en la formulación (Sharma y Márquez, 2001).

La asociación de las mutaciones en el codón 249 del gen *p53* (Moudgil *et al.*, 2013) se evaluó en células de carcinomas hepáticos humanos de pacientes en Monterrey, México, detectándose los antígenos de hepatitis B y/o C y la mutación, en 3 de 16 casos, del gen *p53* y concentraciones de 0.54 a 4.64 pmol de AFB_1 -lisina/mg de albúmina. Los antígenos para el virus de la hepatitis B y/o C fueron positivos en 12 de 20 casos. En estas condiciones aún las concentraciones relativamente bajas de AFB_1 pueden resultar en una situación de alto riesgo dada la exposición diaria (Soini *et al.*, 1996). Resultados semejantes a nivel molecular se reportan en pacientes de Senegal (Coursaget *et al.*, 1993), Estados Unidos, Tailandia y China (Aguilar *et al.*, 1994) y China (Jackson *et al.*, 2003). Carvajal *et al.* (2012) comprobaron la asociación de las aflatoxinas con el VPH (virus del papiloma humano) de los tipos 16 y 18 en cáncer cérvico-uterino; además verificaron la presencia de tumores cancerígenos (hígado, colon, pulmón y páncreas) y la orina de enfermos con cirrosis viral, hepatitis B y C y concluyeron que las aflatoxinas actúan como cofactores que potencian la incidencia de enfermedades en los organismos.

Regulaciones sanitarias. En México se han desarrollado normativas para regular la incidencia de aflatoxinas en cereales. En 2008 se emitió la Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008 que indica que el límite máximo permisible de aflatoxinas en cereales es de 20 $\mu\text{g/kg}$ tanto para el consumo humano como de animales; además, aporta información relativa a las especificaciones sanitarias de transporte y almacenamiento de cereales e indica que el límite máximo de aflatoxinas en harina de maíz nixtamalizado y masa para tortillas es de 12 $\mu\text{g/kg}$ (NOM-247-SSA1-2008). Sin embargo, es notable observar que no existe una regulación similar a la de las aflatoxinas para otras micotoxinas comúnmente presentes en productos agrícolas tales como las fumonisinas y las ocratoxinas (Li *et al.*, 2011); así como para aflatoxinas específicas como la B_1 , la más tóxica, o la M_1 en productos lácteos. Esto indica que es indispensable la implementación de estudios para generar conocimiento relativo a estas micotoxinas para así desarrollar y validar nuevas medidas para el manejo de las mismas, además de la legislación reguladora pertinente. A la fecha se han establecido los límites de aflatoxinas permisibles en los países importadores y exportadores de productos agropecuarios en el mundo. Por ejemplo, en Estados Unidos de América se permiten 20 $\mu\text{g/kg}$ en alimentos, 0.5 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina M_1 en leche (FDA-USA, 2012); en la Unión Europea, sólo se permiten máximo 20 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina B_1 (UE-EFSA, 2002). El Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (2012) indica que sólo

The Food Health Regulations of Chile (2011) indicates that only up to 5 $\mu\text{g/kg}$ of aflatoxins B_1 , B_2 , G_1 and/or G_2 in foods are allowed and up to 0.05 $\mu\text{g/kg}$ of M_1 in milk.

Integrated management strategies. In Mexico, programs involving integrated management for reducing aflatoxins and fungi that produce them, are scarce. In Tamaulipas state, some actions were taken to control aflatoxin contamination, since heavy pollution in the grain (about 90 %) and high levels of aflatoxins (concentrations between 63 and 167 $\mu\text{g/kg}$) (Moreno and Gil, 1991; Carvajal and Arroyo, 1997), occurred in the maize grown in the region during 1989 and 1990, which was associated with the presence of high temperatures and severe pest attack on the reproductive stage of the crop, as well as factors favoring the drastically increased contamination of grain in regional warehouses (high humidity and temperature).

As for the field, the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock Research (INIFAP) developed a technology package for maize cultivation in the northern region of Tamaulipas. The actions described there include early planting date, proper density, adequate irrigation (three auxiliary irrigations) and strict monitoring of pest insects favoring aflatoxigenic fungal infection in the corn cob (Rodríguez *et al.*, 1995; Reyes and Cantú, 2006; Cantú *et al.*, 2010). By 1991, the contaminated grain was reduced to 20 % as a result of the development and application of this technology package. Additionally, in 1992, INIFAP released the hybrid HV-1, a maize type with white semi-toothed grain which is tolerant to planting conditions in soils of second class (Reyes and Cantu, 2003; 2004). Meanwhile, Martínez *et al.*, (2003) reported that aflatoxins concentrations in more than 70 % of the maize grown or stored in Camargo, Gustavo Diaz Ordaz, Matamoros, Reynosa, Rio Bravo, San Fernando and Valle Hermoso in 1998, showed values higher than those accepted by national standards and other countries for grain commercialization (20-233 $\mu\text{g/kg}$).

Later on, in response to the problem of limited water available for irrigation, INIFAP's genetic improvement program oriented its research to the development of tolerance to high temperatures and drought maize. In 2003, the H-437 and H-439 trilinear hybrids were released, which, on average produced 3.7 ton per hectare (Reyes and Cantu, 2003, 2004). H-436 and H-437 hybrids had the lowest percentages of contamination by fungi of the genera *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. (Hernández *et al.*, 2007); meanwhile, in the yellow grain H-443A hybrid, 14 $\mu\text{g/kg}$ of aflatoxins were detected while seven yellow grain hybrids widely grown in northern Tamaulipas showed from 36-218 $\mu\text{g/kg}$ in the seed (Reyes *et al.*, 2009).

From eleven maize genotypes commonly grown in Mexico, Popcorn C-526, Garst 8366, AS910 and 30G40 were resistant to colonization by *A. flavus* and aflatoxins accumulation; while the hybrids 3002W, 30R39, Creole, C-922, HV313 and P3028W were susceptible. The highest concentrations corresponded to AFB_1 (26.1 $\text{mg/kg} \pm 14.7$), while AFB_2 , AFG_1 and AFG_2 showed only residual concentrations. The results demonstrate that there is

deben permitirse hasta 5 µg/kg de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y/o G₂ en alimentos y hasta 0.05 µg/kg de M₁ en leche.

Estrategias de manejo integrado. En la actualidad son escasos, particularmente en México, los programas que incluyan un manejo integral para la disminución de las aflatoxinas y de los hongos productores de las mismas. En el estado de Tamaulipas se tomaron medidas para el control de la contaminación por aflatoxinas a partir de las fuertes contaminaciones en el grano (alrededor del 90 %) y los altos niveles de aflatoxinas (concentraciones entre 63 y 167 µg/kg) (Moreno y Gil, 1991; Carvajal y Arroyo, 1997) ocurridas en el maíz cultivado en la región durante 1989 y 1990; lo que se asoció con la presencia de temperaturas altas y el ataque severo de plagas en la etapa reproductiva del cultivo, así como factores favorecedores del drástico incremento de la contaminación del grano en los almacenes regionales (alta humedad y temperatura).

En el caso del campo, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) desarrolló un paquete tecnológico para el cultivo del maíz en la región norte de Tamaulipas. Estas medidas incluyen la fecha de siembra temprana, la densidad adecuada de siembra, una adecuada irrigación (tres riegos de auxilio) y el monitoreo estricto de insectos plaga favorecedores de la infección por hongos aflatoxigénicos en la mazorca (Rodríguez *et al.*, 1995; Reyes y Cantú, 2006; Cantú-Almaguer *et al.*, 2010). Para 1991 el grano contaminado se redujo al 20 % como resultado del desarrollo y aplicación del paquete tecnológico. Adicionalmente, el INIFAP liberó en 1992 el híbrido HV-1, un maíz con grano blanco semidentado tolerante a condiciones de siembra en suelos de segunda clase (Reyes y Cantú, 2003; 2004). Por su parte, Martínez *et al.* (2003) reportaron que las concentraciones de aflatoxinas en más del 70 % de los maíces cultivados o almacenados en los municipios tamaulipecos de Camargo, Gustavo Díaz Ordaz, Matamoros, Reynosa, Río Bravo, San Fernando y Valle Hermoso en 1998 exhibieron valores mayores a los máximos aceptados por las normas nacionales y de otros países para la comercialización del grano, desde 20 hasta 233 µg/kg.

Posteriormente, y en respuesta al problema de la poca disponibilidad de agua para riego, el programa de mejoramiento genético del INIFAP orientó la investigación a la formulación de maíces tolerantes a las altas temperaturas y sequía. En 2003 se liberaron los híbridos trilineales H-437 y H-439, mismos que produjeron en promedio 3.7 toneladas por hectárea (Reyes y Cantú, 2003, 2004). Los híbridos H-436 y H-437 tuvieron los menores porcentajes de contaminación por hongos de los géneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. (Hernández *et al.*, 2007); por su parte, en el híbrido de grano amarillo H-443A se detectó 14 µg/kg de aflatoxinas mientras que siete híbridos de grano amarillo ampliamente sembrados en el norte de Tamaulipas presentaron de 36 a 218 µg/kg en la semilla (Reyes *et al.*, 2009).

De once genotipos de maíz comúnmente cultivados en México, Popcorn, C-526, Garst 8366, AS910 y 30G40 fueron resistentes a la colonización por *A. flavus* y la acumulación de aflatoxinas; mientras que fueron

differential response to infection and aflatoxins accumulation, and that it is necessary the development of resistant germplasm to this phytosanitary problem (De Luna-López *et al.*, 2013).

All mentioned above, provides a perspective on the severity of recurrent incidence of aflatoxigenic fungi in northern Tamaulipas and U.S. border since the late twentieth century. Also it emphasizes the fact that the relative success in controlling the fungus and their aflatoxins, has been due to the release of germplasm with individual or combined resistance to infection predisposing factors (pests, drought) and not directly. This point is important: it should be proposed the standardization of evaluation and selection techniques of promising germplasm that involve the development of genetic improvement programs focused on the evaluation, selection, crossover and release of germplasm resistant to the pathogen and its metabolites. Similarly, besides the improvement, attention should be paid to the mapping of resistance genes and generation of linkage maps to facilitate the selection of parents and hybridization programs (Cary *et al.*, 2011). In the same way, weather conditions in the field and warehouse also motivate changes in the strategies, as well as the emergence of new toxigenic strains in maize growing regions that affect the genetic structure of *Aspergillus* communities (Cotty and Jaime-García, 2007; Jaime-García and Cotty, 2010). This motivates the constant change of cropping pattern in the region, as urgent and radical action, to reduce the incidence of these fungi as well as constant research and definition of new strategies for integrated problem management (Jaime-García and Cotty, 2010).

Control measures in field and storage. *Aspergillus* or its toxins control in the maize plant has involved the use of chemicals for their eradication. However, this strategy is relatively expensive. Insects that could act as vectors to facilitate the entry of conidia into the corncob have generated resistance to insecticides. In addition to this, there are restrictions on the use of pesticides given the environmental regulations. In Mexico, some coleoptera in corn such as *Carpophilus fremani*, *Carthartus quadricollis* and *Sitophilus zaemais* have been identified; among them, *Sitophilus* is associated to 90 % of *A. flavus* infections in the field (García *et al.*, 2003). As for biological control, it has been shown that growth reduction, aflatoxin production or even modification of aflatoxins structures has been due to the action of some bacteria and fungi such as *A. niger*, *Rhodococcus corynebacterioides* (*Niocardia corynebacteroides*), *Candida parapsilosis*, *Myxococcus fulvus*, *Mucor ambiguus* and *Trichoderma viride*. However, most of these studies have been carried out under laboratory conditions (Suárez *et al.*, 2007; Tejada-Castañeda *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Aliabadi *et al.*, 2013; Devreese *et al.*, 2013). Bacteria of the *Bacillus* genus has shown anti-fungal activity against *A. flavus* (Moyné *et al.*, 2001; Taylor and Draughon, 2001). Palumbo *et al.* (2006) reported that *Bacillus* provides an effective antagonist to *A. flavus* growth in almonds. Meanwhile, Gao *et al.* (2011) found that a *B. subtilis* strain obtained from fish intestines was able to

susceptibles los híbridos 3002W, 30R39, Creole, C-922, HV313 y P3028W. Las concentraciones mayores correspondieron a AFB₁ (26.1 mg/kg ± 14.7), mientras que AFB₂, AFG₁ and AFG₂ presentaron concentraciones residuales. Los resultados indican que hay respuesta diferenciada a la infección y acumulación de aflatoxinas y hace necesario el desarrollo de germoplasma resistente a este problema fitosanitario (De Luna-López *et al.*, 2013).

Lo anterior ofrece una perspectiva de la recurrente gravedad de la incidencia de hongos aflatoxigénicos en la región norte de Tamaulipas y fronteriza con EUA desde fines del siglo XX. También, hace notar el hecho que los relativos éxitos en el control del hongo y de sus aflatoxinas no se han obtenido directamente sino que, indirectamente y a través de la liberación de germoplasma con resistencias individuales o combinadas a factores favorecedores de la infección (plagas, sequía) se logran reducciones significativas. Este punto es de importancia: debe proponerse la estandarización de técnicas de evaluación y selección de germoplasma promisorio que conlleve el desarrollo de programas de mejoramiento genético enfocados en la evaluación, selección, cruzamiento y liberación de germoplasma resistente al patógeno y sus metabolitos. De igual forma, debe ponerse atención, a la par del mejoramiento como tal, en el mapeo de genes de resistencia y generación de mapas de ligamiento que faciliten la selección de progenitores y los programas de hibridación (Cary *et al.*, 2011). De igual forma, las condiciones climáticas en campo y almacén también motivan cambios en las estrategias, así como la aparición de nuevas cepas toxigénicas en las regiones maiceras y que afectan la estructura genética de las comunidades de *Aspergillus* (Cotty y Jaime-García, 2007; Jaime-García y Cotty, 2010). Ello motiva a la constante modificación del patrón de cultivos en la región como medida urgente y radical para reducir la incidencia de dichos hongos así como la constante búsqueda y definición de nuevas estrategias de manejo integrado del problema (Jaime-García y Cotty, 2010).

Medidas de control en campo y almacén. El control de *Aspergillus* o sus toxinas en la planta de maíz ha consistido en la utilización de productos químicos para su erradicación. Sin embargo esta estrategia es relativamente costosa. Los insectos que podrían actuar como vectores al facilitar la entrada de conidios dentro de la mazorca han generado resistencia a los insecticidas. Aunado a lo anterior existen restricciones en el uso de plaguicidas dadas las regulaciones ambientales. En México se han identificado algunos coleópteros presentes en maíz como *Carpophilus fremani*, *Carthartus quadricollis* y *Sitophilus zeamais*; de ellos, *Sitophilus* se asocia con 90 % de las infecciones por *A. flavus* en campo (García *et al.*, 2003). En cuanto al control biológico se ha comprobado la reducción del crecimiento o de la producción de aflatoxinas o incluso la modificación de las estructuras de las aflatoxinas debido a la acción de bacterias y hongos tales como *A. niger*, *Rhodococcus corynebacterioides* (*Niocardia corynebacteroides*), *Candida parapsilosis*, *Myxococcus fulvus*, *Mucor ambiguus* y *Trichoderma viride*. No obstante, la mayoría de esos

detoxify toxins and degrade B₁, M₁ and G₁ aflatoxins in an 80, 60 and 80 %, respectively. Among the mechanisms used by such microorganisms to reduce *Aspergillus* growth or aflatoxins production are: competition for space and/or nutrients, antibiosis via synthesis of degrading enzymes, parasitism or the binding of aflatoxin molecules to the cell walls of the biocontrol microorganism based on their marked hydrophobicity (Niknejad *et al.*, 2012). This leads to consider this strategy as a promising alternative in the aflatoxins management.

The butylated hydroxyanisole (BHA), butyl hydroxy toluene (BHT) and propyl paraben (PP) compounds, control the growth and aflatoxin synthesis of *A. flavus* and *A. parasiticus* in stored grain (Thompson, 1992). Moreno and Vázquez (2000) evaluated the effectiveness of ammonium, calcium and sodium propionates in reducing the incidence of *A. flavus* and its aflatoxins in Tamaulipas corn. These three propionates reduced the incidence of aflatoxins below 20 µg/kg; however, fungistats phytotoxicity was observed in the corn germination, as germinating grain treated with four doses of ammonium propionate was close to zero. Other compounds reduce fungal growth and host contamination (Lira, 2003). Tequida *et al.* (2002) reported that 'gobernadora' (*L. tridentata*) methanolic and/or ethanolic alcoholic extracts inhibited *A. flavus* and *A. niger* growth in a 40 to 100 % range. Rocha-Vilela *et al.* (2009) found that the 1,8-cineole compound isolated from *Eucalyptus globulus* inhibited the growth and production of aflatoxin B₁ of *A. flavus* and *A. parasiticus*. Meanwhile, Moreno and González (2011) reported that 'gobernadora' alcoholic extracts (3-7 mg / mL) inhibited up to 100 % *A. flavus* growth. El-Nagerabi *et al.* (2013) evaluated leaf extracts, resins and essential oils from *Boswellia sacra* for *A. flavus* and *A. parasiticus* control; the resin and essential oil inhibited between 40 and 90 % the growth and aflatoxins secretion of both fungal genera. Plant extracts or other biocontrol agents usually contain substances that show a direct effect on the reduction or complete inhibition of *Aspergillus* growth via degradation of structural wall and membrane components and organelles (Nogueira *et al.*, 2010). For example, guaiaretic acid, linoleic acid, quinones, terpenes, coumarins, precocenes, glycosides, carnosic acid, etc., have been reported (Tequida *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2010; Moreno-González *et al.*, 2011). The results of these studies with plant extracts are promising considering that emphasis should be placed on the characterization and detection of compounds useful for the management of toxigenic fungi in maize grain.

Another method involves the use of silo bags made from polystyrene and UV filter. The most commonly used size is 60-75 m long and 2.7 m wide. Each bag can store 200 tons of grain. This method is economically affordable and it provides an efficient way to preserve the grain (Fornieles, 2001).

The management strategy that has proven effective in reducing aflatoxin contamination in pre and post-harvest maize, is the use of *A. flavus* atoxigenic breeds (non-toxin producers), which by competing for the same substrates for growth and development, displace populations of toxigenic

estudios se ha realizado en condiciones de laboratorio (Suárez *et al.*, 2007; Tejada-Castañeda *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Aliabadi *et al.*, 2013; Devreese *et al.*, 2013). Las bacterias del género *Bacillus* muestran actividad antifúngica contra *A. flavus* (Moyné *et al.*, 2001; Taylor y Draughon, 2001). Palumbo *et al.* (2006) informaron que *Bacillus* ofrece un efectivo antagonista al crecimiento de *A. flavus* en almendras. Por su parte, Gao *et al.* (2011) observaron que una cepa de *B. subtilis* obtenida de intestinos de peces fue capaz de detoxificar las toxinas y de degradar las aflatoxinas B₁, M₁ y G₁ en un 80, 60 y 80 %, respectivamente. Entre los mecanismos utilizados por los microorganismos antes señalados para reducir el crecimiento de *Aspergillus* o la producción de las aflatoxinas están la competencia por espacio y/o nutrientes, antibiosis vía la síntesis de enzimas degradadoras, parasitismo, o bien, la unión de las moléculas de la aflatoxina a las paredes celulares del microorganismo biocontrolador en virtud de su marcada hidrofobicidad (Niknejad *et al.*, 2012). Ello lleva a considerar esta estrategia como una alternativa promisoría en el manejo de aflatoxinas.

Los compuestos Butil-hidroxianisol (BHA), Butil-Hidroxi-tolueno (BHT) y Propil-parabeno (PP) controlan el crecimiento y la síntesis de aflatoxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Thompson, 1992) en granos almacenados. Moreno y Vázquez (2000) evaluaron la efectividad de los propionatos de amonio, de calcio y de sodio en la reducción de la incidencia de *A. flavus* y sus aflatoxinas en maíz de Tamaulipas. Los tres propionatos redujeron la incidencia de aflatoxinas por debajo de los 20 µg/kg; sin embargo, se observó fitototoxicidad de los fungistatos en la germinación del grano de maíz pues la germinación del grano tratado con las cuatro dosis del propionato de amonio fue cercana a cero. Otros compuestos reducen el crecimiento del hongo y la consiguiente contaminación del hospedante (Lira, 2003). Tequida *et al.* (2002) reportaron que extractos alcohólicos metanólicos y/o etanólicos de 'gobernadora' (*L. tridentata*) inhibieron el crecimiento de *A. flavus* y *A. niger* en un rango de 40 hasta 100 %. Rocha-Vilela *et al.* (2009) determinaron que el compuesto 1,8-cineol aislado de *Eucalyptus globulus* inhibió el crecimiento y la producción de aflatoxina B₁ de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Por su parte, Moreno y González (2011) indicaron que los extractos alcohólicos de 'gobernadora' (3 a 7 mg/mL de concentración) inhibieron hasta 100 % el crecimiento de *A. flavus*. El-Nagerabi *et al.* (2013) evaluaron extractos de hoja, resinas y aceites esenciales de *Boswellia sacra* para el control de *A. flavus* y *A. parasiticus*; la resina y el aceite esencial inhibieron, entre 40 y 90 %, el crecimiento y la secreción de aflatoxinas de ambos géneros fúngicos. Los extractos de plantas u otros agentes biocontroladores usualmente contienen sustancias que muestran un efecto directo en la reducción o total inhibición del crecimiento de *Aspergillus*, vía degradación de componentes estructurales de pared y membrana y organelos (Nogueira *et al.*, 2010). Por ejemplo, se reportan ácido guaiarético, ácido linoléico, quinonas, terpenos, cumarinas, precocenos, glicósidos,

fungi (Yin *et al.*, 2008; Degola *et al.*, 2011). This biological control is used in the southern United States (Arizona, California, Texas) in corn, cotton, peanut and pistachio crops, where aflatoxins incidence is reduced from 70-90 % (Pitt and Hocking, 2006; Dorner, 2008; Abbas *et al.*, 2011a). For effective competitive exclusion, nontoxigenic strains feasible to be used as biocontrol, must be prevalent in farm environments when crops are susceptible to infection by toxigenic strains. Some characteristics of such strains are their capacity for growth and sporulation, genetic stability, ability to adapt to unfavorable environments and control of aflatoxins, cyclopiazonic acid and fumonisins synthesis (Abbas *et al.*, 2011b). The strains that have shown better results in the field and under storage for *A. flavus* are AF36, NRRL21882 (Alfa Guard®), CT3 and K49 and NRRL21369 for *A. parasiticus*, among others that have promoted variable reductions in aflatoxins, cyclopiazonic acid and fumonisins synthesis in corn and other crops, ranging from 20 to 90 % compared to untreated plants (Abbas *et al.*, 2006; 2011a; 2011b). New biocontrol strategies, even in the field evaluation, consist of applying atoxigenic *A. flavus* strain mixed with bioplastic substrates. For example, the mixture of conidia of the atoxigenic strain with a bioplastic starch-based (Mater-Bi®) is being tested (Accinelli *et al.*, 2009; 2012); as well as the application of the strain to the corncob (more effective than when applied in the soil) mixed in water dispersible granules based on clay, also with promising control results (Abbas *et al.*, 2011b).

Measures to decontaminate the grain. The ideal decontamination process should be cheap, simple and without producing toxic secondary compounds or that alter the nutritional characteristics and palatability during or after use (Elias *et al.*, 2002). In Mexico, physical methods have mainly been used such as nixtamalization, extrusion and removal by adsorbents. According to Guzmán *et al.*, (1995) and Anguiano *et al.* (2005), nixtamalization process destroys up to 95-100 % of aflatoxins in maize. In this sense, also Pérez-Flores *et al.* (2011) reported that a modified process for making tortillas based on microwaves reduced between 68 and 84 % the incidence of B₁ and B₂ aflatoxins; Torres *et al.* (2001) found reductions of 52, 85 and 79 % of aflatoxins in tortillas, chips and fries, respectively. While nixtamalization reduced levels of AFB₁, AFM₁ and AFB₁ 8-9 dihydrodiol at 94, 90 and 93 % respectively, in samples with high levels of contamination, the extrusion of corn grain with water containing 0.3 % lime and 1.5 % hydrogen peroxide, reduced 100 % their levels; besides, lime and hydrogen peroxide did not affect tortillas aroma and flavor. Various modifications of nixtamalization and extrusion and their combination, were evaluated based on their effects on the removal of contaminants and the tortillas quality, although some are costly or require more energy. Most of these processes have not been commercially used to decontaminate maize, although their study could have applications and promising results in the short term (Personal Communication. Juan De Dios Figueroa-Cardenas, PhD. CINVESTAV-IPN Unidad Querétaro. Querétaro, México. 2012). Similarly, the use of natural

ácido carnósico, etc. (Tequida *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2010; Moreno y González *et al.*, 2011). Los resultados de estos trabajos con extractos de plantas son promisorios en virtud de que debe ponerse énfasis en la caracterización y detección de compuestos con utilidad para el manejo de hongos toxígenos del grano de maíz.

Otro método consiste en el uso de bolsas de silo fabricadas con poliestireno y filtro de rayos ultravioleta. El tamaño más utilizado es de 60-75 m de largo y 2.7 m de ancho. Cada bolsa puede almacenar unas 200 ton de grano. Dicho método es económicamente costeable ya que proporciona una forma eficiente de preservar el grano (Fornieles, 2001).

La estrategia de manejo que ha mostrado ser efectiva en la reducción de la contaminación de aflatoxinas en pre y post cosecha del maíz consiste en el uso de razas atoxigénicas (que no producen toxinas) de *A. flavus*, mismas que por competencia por los mismos sustratos para el crecimiento y desarrollo desplazan a las poblaciones de hongos toxigénicos (Yin *et al.*, 2008; Degola *et al.*, 2011). Esta medida de control biológico se utiliza en el sur de Estados Unidos (Arizona, California, Texas) en cultivos como maíz, algodón, cacahuate y pistache, donde la incidencia de aflatoxinas se reduce del 70 hasta 90 % (Pitt y Hocking, 2006; Dorner, 2008; Abbas *et al.*, 2011a). Para que la exclusión competitiva sea eficaz, las cepas no toxigénicas factibles para aplicarse a manera de biocontrol deben ser predominantes en los entornos agrícolas cuando los cultivos son susceptibles de ser infectados por las cepas toxigénicas. Algunas características de dichas cepas son su capacidad de crecimiento y esporulación, su estabilidad genética, capacidad para adaptarse a ambientes desfavorables y control de la síntesis de aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y fumonisinas (Abbas *et al.*, 2011b). Las cepas que mejores resultados han mostrado en campo y almacén son AF36, NRRL21882 (Alfa Guard®), CT3 y K49 de *A. flavus* y NRRL21369 de *A. parasiticus*, entre otras mismas que han promovido reducciones variables en la síntesis de aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y fumonisinas en maíz y otros cultivos, que van desde un 20 a un 90 % en comparación con plantas no tratadas (Abbas *et al.*, 2006; 2011a; 2011b). Nuevas estrategias de biocontrol, aún en evaluación en campo, consisten en aplicar la cepa atoxigénica de *A. flavus* mezclada con sustratos bioplásticos. Por ejemplo, se está probando la mezcla de los conidios de la cepa atoxigénica con un bioplástico basado en almidón (Mater-Bi®) (Accinelli *et al.*, 2009; 2012); así como la aplicación de la cepa a la mazorca (más eficaz que al aplicarse en el suelo) mezclada en gránulos dispersables en agua basados en arcilla, igualmente con resultados de control promisorios (Abbas *et al.*, 2011b).

Medidas para descontaminar el grano. El proceso de descontaminación ideal debe ser barato, sencillo y que no produzca compuestos secundarios tóxicos o que altere las características nutrimentales y de palatabilidad durante o después de su utilización (Elias *et al.*, 2002). En México se han utilizado principalmente métodos físicos como la nixtamalización, extrusión y eliminación por adsorbentes. De acuerdo con Guzmán *et al.* (1995) y Anguiano *et al.*

decontaminating or synthetic substances known as 'sequestering' (clays, zeolites, bentonites, activated carbon, aluminosilicates, polymers and products of the yeast cell wall) may counteract aflatoxins toxicity (Ramos and Hernández, 1997; Boudergue *et al.*, 2009; Tapia-Salazar *et al.*, 2010); unlike Mexico, these strategies have been evaluated experimentally in cattle in Europe (Devreese *et al.*, 2013).

DISCUSSION AND PERSPECTIVES

Maize is the most important food in Mexico, so it is necessary to optimize its production and conservation safely. The attack of various pathogens in the field and during storage cause damage to the production; however, there are not direct and effective measures to reduce or annul infections caused by toxigenic fungi of the corncob, but only preventive measures that weaken the infection or production of such toxins. One such measure is the change in planting dates so that the most sensitive phase of the corn life cycle, the reproductive one, does not coincide with favorable environmental conditions, environmental stress, infection or high incidence of aflatoxigenic fungi. This measure is applied in conjunction with the use of hybrids with tolerance to stress factors, such as high temperatures and drought stress (Reyes and Cantú, 2006). The high incidence of toxigenic fungi in corn, and the incidence of their contaminant mycotoxins are of particular concern in corn produced in regions, such as northeastern Mexico and in Europe, America and Africa. This is vital if production is mostly intended for human consumption as in Africa and Latin America.

Agronomic impacts experienced by the United States due to the loss of grains in the field and in storage, showed the need to generate effective proposals to minimize the aflatoxigenic fungi incidence. Efforts have been directed towards the development or adaptation of cultural practices such as tillage, fertilization, planting density, irrigation, pest control and planting dates, genetic improvement and mapping of resistance genes (Cary *et al.*, 2011; Devreese *et al.*, 2013; Magnussen and Parsi, 2013), among others. In Mexico, something similar occurred, particularly in maize growing areas of the northern part of the country, where some studies generated technological packages, particularly by INIFAP, that tried to minimize aflatoxin contamination on the corncob, tolerance to environmental stress and maximizing the yield potential of the maize grain (Reyes y Cantú, 2006), but despite all the efforts, the effects caused by the aflatoxigenic fungi are recurrent and sometimes significant.

For all the reasons mentioned above, some research areas should be followed in the medium and long term, with at least, strong emphasis on maize growing regions of Mexico where *Aspergillus* and its aflatoxins are important. Diagnosis and timely assessment of damage by fungi and pests must continue, as well as the identification of associations, response measurements and generation of technological packages that gradually allow to reduce or completely inhibit the aflatoxigenic fungi, aflatoxin contamination and a maize production of high health and

(2005), el proceso de nixtamalización destruye del 95 al 100 % de las aflatoxinas del maíz. En este sentido, también Pérez-Flores *et al.* (2011) reportaron que un método modificado para fabricar tortillas basado en el uso de microondas redujo entre 68 y 84 % la incidencia de aflatoxinas B₁ y B₂; Torres *et al.* (2001) encontraron reducciones de 52, 85 y 79 % de aflatoxinas en tortillas, totopos y frituras, respectivamente. Mientras que la nixtamalización redujo los niveles de AFB₁, AFM₁, y AFB₁ 8-9 dihidrodiol en 94, 90 y 93 % respectivamente en muestras con altos niveles de contaminación, la extrusión del grano de maíz con agua conteniendo 0.3 % de cal y 1.5 % de peróxido de hidrógeno redujo al 100 %; además, la cal y el peróxido de hidrógeno no afectaron el aroma y el sabor de las tortillas. Diversas modificaciones de la nixtamalización, la extrusión y la combinación de ambas se han evaluado con base en sus efectos en la eliminación de contaminantes y la calidad de la tortilla, aunque algunos resultan costosos o requieren más energía. La mayoría de estos procesos no se han utilizado comercialmente para descontaminar maíz, aunque su estudio podría tener aplicaciones y resultados promisorios en el corto plazo (Comunicación Personal. Dr. Juan De Dios Figueroa-Cárdenas. CINVESTAV-IPN Unidad Querétaro. Querétaro, México. 2012). Así mismo, el uso de sustancias descontaminantes naturales o sintéticas denominadas 'secuestrantes' (arcillas, zeolitas, bentonitas, carbón activado, aluminosilicatos, polímeros y productos de la pared celular de levaduras) pueden contrarrestar la toxicidad de las aflatoxinas (Ramos y Hernández, 1997; Boudergue *et al.*, 2009; Tapia-Salazar *et al.*, 2010); a diferencia de México, éstas estrategias se han evaluado experimentalmente en ganado en Europa (Devreese *et al.*, 2013).

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El maíz es el alimento más importante en la República Mexicana, por lo que es necesario optimizar su producción y conservación de manera inocua. El ataque de diversos patógenos en el campo y el almacén causan daños a la producción; no obstante, no se utilizan de manera generalizada medidas de control directas y efectivas para reducir o anular la infección por hongos toxígenos de la mazorca, salvo medidas preventivas que desfavorecen la infección o la producción de dichas toxinas. Una de estas medidas consiste en la modificación de las fechas de siembra de modo que la fase sensible del ciclo biológico del maíz, la reproductiva, no coincida con las condiciones ambientales favorables o al estrés ambiental o a la alta incidencia e infección de hongos aflatoxigénicos. Esta medida se aplica en conjunto con el uso de híbridos con tolerancia a factores de estrés, como las altas temperaturas y el déficit hídrico (Reyes y Cantú, 2006). La alta incidencia de hongos toxígenos en maíz y la ocurrencia de sus micotoxinas contaminantes son particularmente preocupantes en el maíz producido en regiones como el noreste de México, así como a nivel mundial en Europa, América y África. Esto es de vital importancia si la producción se destina mayormente al consumo humano como ocurre en África y América Latina.

nutritional values, and especially in those production regions with recurrent aflatoxigenic fungi damage. One very important area of research consists on the systematic evaluation of non-toxicogenic strains in maize germplasm of white or yellow grain adapted to each agro-ecological region, so that their efficiency is validated in the control of fungi and aflatoxins in Mexico, particularly in the medium and long term in the context of global climate change and with the combination of multidisciplinary research groups (agronomists, molecular biologists, breeders, plant pathologists, meteorologists, etc.) (Paterson and Lima, 2010; 2011). Another research area could be the development of basic and applied *Aspergillus* research and its aflatoxins in Mexico, because the studies at genetic-molecular level are limited in Mexican strains of the fungus and its aflatoxins, as well as the integrative study of the pathosystem maize-*Aspergillus*-aflatoxins. Little is known of analyses at genetic level, genetic structure of populations, morphotypes distribution, morphotypes-genotype maize interactions, etc. Consistent studies on functional genomics of the pathosystem components and their interactions have not been done, especially those under specific environmental conditions such as drought stress and/or high temperatures, which are grouped into the mechanism known as 'quorum-sensing' and 'Velvet complex' identified in *A. flavus* and its implications in the routes of the secondary metabolism (Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna and Payne, 2009; Amaike and Keller, 2011; Amare and Keller, 2014).

It is also necessary to maintain the pre-harvest care to avoid contamination by fungi. In the field, to provide good levels of moisture and prevent water stress, and in the soil, good fertility or supplemented with the recommended levels of nutrients for the crop. Once the harvest has been verified, care should be taken that the humidity in the storage room is low and provide ventilation to prevent the formation of 'hot spots' in warehouses or silos (Bucio *et al.*, 2001; Magan and Aldred, 2007). Another option is the use of substances such as organic acids which inhibit fungi growth or enzymes that selectively degrade aflatoxins (Magan and Aldred, 2007).

A new alternative is based on the experimental release and pilot planting of germoplasm of transgenic corn or genetically modified corn with individual resistors, or 'stacked', against herbicides (glyphosate, glufosinate ammonium), lepidopteran pests, roots and stems pests that, at least in northern Tamaulipas, show resistance to lepidopteran pests of the corncob and lower fungal infection levels potentially toxicogenic in the corncob (SENASICA, 2014). However, the research is still ongoing and without conclusive results, but previous reports of Reddy *et al.* (2007) concluded that the use of maize germplasm with resistance to glyphosate and that allows weed control with such herbicide, showed increments in the *A. flavus* incidence in the herbicide-treated soil, although no increments in the presence aflatoxin and fumonisin in the grain. Apparently, glyphosate joins soil colloidal matrix leaving smaller proportion of bioavailable material to interfere with the growth of aflatoxigenic fungi, or even with non aflatoxigenic strains used as biocontrol (Accinelli *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2008).

Los impactos agronómicos que han experimentado los Estados Unidos de América debido a la pérdida de granos en campo y almacén evidenció la necesidad de generar propuestas efectivas para minimizar la incidencia de hongos aflatoxigénicos. Los esfuerzos se han dirigido al desarrollo o adecuación de las prácticas de cultivo como la labranza, fertilización, densidad de siembra, irrigación, control de insectos y fechas de siembra, mejoramiento genético y mapeo de genes de resistencia (Cary *et al.*, 2011; Devreese *et al.*, 2013; Magnussen y Parsi, 2013), entre otras. En México sucedió algo similar, particularmente en las zonas maiceras del norte del país, se desarrollaron estudios que generaron paquetes tecnológicos, particularmente por el INIFAP, que trataron de minimizar la contaminación por aflatoxinas en la mazorca, la tolerancia al estrés ambiental y maximizando el potencial de rendimiento de grano del cultivo (Reyes y Cantú, 2006). A pesar de esto, las afectaciones por los hongos aflatoxigénicos son recurrentes y, en ocasiones, significativas.

Lo anterior propone algunas líneas de investigación que deberían seguirse en el mediano y largo plazos al menos con marcado énfasis en las regiones maiceras de México donde *Aspergillus* y sus aflatoxinas son importantes. Debe continuarse el diagnóstico y la evaluación oportuna de los daños por hongos y plagas, identificar asociaciones, medir respuestas y generar paquetes tecnológicos que permitan paulatinamente reducir o inhibir por completo a los hongos aflatoxigénicos, la contaminación por aflatoxinas y una producción de maíz con alta calidad sanitaria, nutrimental y rentable en aquellas regiones productoras que presentan daños recurrentes por hongos aflatoxigénicos. Un nicho de oportunidad, consiste en la evaluación consistente y sistemática de cepas no toxígenas en el germoplasma de maíz con grano blanco o amarillo, adaptado a cada región agroecológica, de modo que se valide su pertinencia en el control de los hongos y sus aflatoxinas en México, particularmente en el mediano y largo plazo en el contexto del cambio climático global y con la integración de grupos de investigación multidisciplinarios (agronomos, biólogos moleculares, mejoradores, fitopatólogos, meteorólogos, etc.) (Paterson y Lima, 2010; 2011). Otro nicho de oportunidad se basa en el desarrollo de investigación básica y aplicada de *Aspergillus* y sus aflatoxinas en México, pues es escaso el estudio a nivel genético-molecular en cepas Mexicanas del hongo y de sus aflatoxinas, así como del estudio integrativo del patosistema maíz-*Aspergillus*-aflatoxinas. Poco se sabe del análisis a nivel genético, de estructura genética de poblaciones, distribución de morfotipos, interacciones morfotipos-genotipos de maíz, etc. Tampoco se conducen estudios consistentes relativos a la genómica funcional de los componentes del patosistema ni de su interacción, bajo condiciones ambientales particulares como estrés por sequía y/o altas temperaturas, lo que se agrupa en el mecanismo denominado 'quorum-sensing' y el 'complejo Velvet' identificados en *A. flavus* y sus implicaciones en las rutas del metabolismo secundario (Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna y Payne, 2009; Amaike y Keller, 2011; Amare y Keller, 2014).

Es necesario, además, mantener los cuidados previos

CONCLUSIONS

Currently in Mexico, the status of *Aspergillus* and its mycotoxins studies in maize, has shown significant progress, so that high incidences and damage observed in past decades have been significantly reduced. However, the problem persists because the factors favoring the occurrence of toxigenic fungi in the field and warehouse can suddenly occur, causing huge losses in the agricultural sector. Therefore, it is imperative to continue with the diagnosis and analysis of the incidence and damage caused by aflatoxins in Mexican maize. It is therefore necessary to establish prevention programs that include the following: 1) the dissemination of economic and health problems caused by aflatoxins contamination, 2) the use of the Hazard Analysis Critical Control Point Systems, HACCPs), 3) to develop and consolidate the efficiency of new chemical, cultural and/or biological strategies for the incidence of aflatoxigenic fungi and its aflatoxins; 4) to maintain the genetic improvement of maize for resistance to insect pests, environmental stress factors such as drought and high temperatures, and lay the foundation for consistent genetic improvement focused in genetic characterization and progenitor identification, selection, crossbreeding and mapping of resistance genes to infection by aflatoxigenic fungi or inhibitors of the synthesis of aflatoxins, and 5) to establish and maintain programs for epidemiological health and diagnosis in both humans and animals, together with the establishment of official norms and specific diagnostic and quantification methods that are cheap, reproducible, rapid, sensitive and reliable for aflatoxins in Mexican corn.

Acknowledgements. The first author acknowledges funding provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant number 421712) and to the PIFI program (grant number B110668) of the Instituto Politécnico Nacional by funding her graduate studies at the CBG-IPN. Publication costs of this work are funded by the Tamaulipas PRODUCE Foundation (projects 2009-1750 and 2012-2112) and the Instituto Politécnico Nacional.

LITERATURA CITADA

- Abbas HK, Zablotowicz RM, Bruns HA, and Abel CA. 2006. Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology* 16:437-449.
- Abbas HK, Zablotowicz RM, Horn BW, Phillips NA, Johnson BJ, Jin X, and Abel CA. 2011a. Comparison of major biocontrol strains of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* for the reduction of aflatoxins and cyclopiazonic acid in maize. *Food Additives and Contaminants* 28:198-208.
- Abbas HK, Weaver MA, Horn BW, Carbone I, Monacell JT, and Shier WT. 2011b. Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews* 30:59-70.
- Accinelli C, Koskinen WC, Seebinger JD, Vicari A, and Sadowsky MJ. 2005. Effects of incorporated corn residues on glyphosate mineralization and sorption in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

a la cosecha para evitar la contaminación por hongos. En campo, proveer buenos niveles de humedad y evitar el estrés hídrico, así como suelos con buena fertilidad o suplementado con los niveles de nutrimentos recomendados para el cultivo. Una vez verificada la cosecha, debe procurarse que las condiciones de humedad en el almacén sean bajas, proporcionar aireación para evitar la formación de 'puntos calientes' en los almacenes o silos (Bucio *et al.*, 2001; Magan y Aldred, 2007). Otra opción es el uso de sustancias como los ácidos orgánicos que inhiben el crecimiento de los hongos o bien, enzimas que degradan selectivamente las aflatoxinas (Magan y Aldred, 2007).

Una nueva alternativa se basa en la liberación experimental y en siembra piloto de germoplasma de maíz transgénico o genéticamente modificado con resistencias individuales o 'apiladas' a herbicidas (glifosato, glufosinato de amonio), plagas de lepidópteros, plagas de raíces y tallos que, al menos en el norte de Tamaulipas, muestran resistencia a plagas de lepidópteros de la mazorca y menores niveles de infección por hongos potencialmente toxígenos en la mazorca (SENASICA, 2014). Sin embargo, la investigación está en proceso y aún no se tienen resultados concluyentes y, adicionalmente, están los resultados previos de Reddy *et al.* (2007) quienes concluyeron que el uso de germoplasma de maíz con resistencia a glifosato y que permite el control de malezas con dicho herbicida, mostró incrementos en la incidencia de *A. flavus* en el suelo tratado con el herbicida, aunque no incrementos en la presencia de aflatoxinas y fumonisinas en el grano. Aparentemente, el glifosato se une a la matriz coloidal del suelo dejando menor proporción de material biodisponible para interferir con el crecimiento del hongo aflatoxigénico o, incluso, con cepas no aflatoxigénicas usadas como biocontrol (Accinelli *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

El estado actual del estudio de *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz ha mostrado avances importantes en fechas recientes en México, de modo que las altas incidencias y daños observados en décadas pasadas se han reducido significativamente. Sin embargo, el problema persiste debido a que se pueden presentar los factores que propician la incidencia de hongos toxigénicos en campo y almacén, generando pérdidas millonarias en el sector agrícola. Por ello, es imperativo continuar con el diagnóstico y análisis de la incidencia y daños por aflatoxinas en el cultivo del maíz en México. Por ello se considera necesario establecer programas de prevención que incluyan los siguientes puntos: 1) divulgación de los problemas económicos y de salud causados por la contaminación con aflatoxinas, 2) utilización de programas de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de los Sistemas de Control ('Hazard Analysis Critical Control Point Systems', HACCP), 3) desarrollar y consolidar la evaluación de las nuevas estrategias de tipo químico, cultural y/o biológico de la incidencia de hongos aflatoxigénicos y sus aflatoxinas; 4) mantener el mejoramiento genético del maíz por resistencia a plagas de insectos, factores de estrés ambiental como sequía y altas temperaturas y sentar las bases para el

- 53:4110-4117.
- Accinelli C, Saccà ML, Abbas HK, Zablutowickz RM, and Wilkinson JR. 2009. Use of a granular bioplastic formulation for carrying conidia of a non-aflatoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Bioresource Technology* 100:3997-4004.
- Accinelli C, Mencarelli M, Saccà ML, Vicari A, and Abbas HK. 2012. Managing and monitoring of *Aspergillus flavus* in corn using bioplastic-based formulations. *Crop Protection* 32:30-35.
- Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M, and Cerutti P. 1994. Geographic variation of p53 mutational profile in non-malignant human liver. *Science* 264:1317-1319.
- Aliabadi MA, Alikhani FE, Mohammadi M, and Darsanaki RK. 2013. Biological control of aflatoxins. *European Journal of Experimental Biology* 3:162-166.
- Alvarado CM, Díaz FA, Delgado AE, and Montes GN. 2010. Impact of corn agronomic management on aflatoxin (*Aspergillus flavus*) contamination and charcoal stalk rot (*Macrophomina phaseolina*) incidence. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12:575-582. 32 p.
- Amaike S and Keller NP. 2011. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 49:107-133.
- Amare MG and Keller NP. 2014. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology* (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.008>
- Anguiano RGL, Verver A, Vargas C y Guzmán-De Peña D. 2005. Inactivación de aflatoxina B₁ y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud Pública de México* 47:369-375.
- ASERCA, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. 2012. Boletín ASERCA Regional Peninsular 2012: La Industrialización del Maíz. 56/12. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Mérida, México. 32 p.
- Boudergue C, Burel C, Dragacci S, Favrot MC, Fremy JM, Massimi C, Prigent P, Debongnie P, Pussemier L, Boudra H, Morgavi D, Oswald I, Perez A, and Avantaggiato G. 2009. Review of mycotoxin - detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *Scientific Report CFP/EFSA/FEEDAP/2009/1*. European Food Safety Authority (EFSA). Parma, Italy. 192 p.
- Bhatnagar D, Cary JW, Ehrlich K, Yu J, and Cleveland TE. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 162:155-166.
- Bucio VCM, Guzmán ODA, and Peña CJJ. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 18:83-87.
- Cantú-Almaguer MA, Reyes-Méndez CA y Rodríguez del Bosque LA. 2010. La Fecha de Siembra: Una alternativa para Incrementar la Producción de Maíz. Folleto Técnico no. 44. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP-SAGARPA. Río Bravo, México. 40 p.
- Carvajal M. 2013. Transformación de la aflatoxina B₁ de

mejoramiento genético consistente enfocado a la caracterización genética e identificación de progenitores, su cruce y selección y mapeo de genes de resistencia a la infección por hongos aflatoxigénicos o inhibitorios de la síntesis de aflatoxinas y 5) establecer y mantener programas de salud epidemiológica y de diagnóstico tanto en humanos como en animales, conjuntamente con la creación de normas oficiales y métodos de diagnóstico y cuantificación específicos baratos, reproducibles, rápidos, sensibles y confiables para las aflatoxinas en el maíz producido en México.

Agradecimientos. La primera autora agradece el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (beca número 421712) y del programa PIFI beca número B110668 del Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento de sus estudios de posgrado en el CBG-IPN. Los costos de publicación de este trabajo son financiados por la Fundación PRODUCE Tamaulipas (proyectos 2009-1750 y 2012-2112) y el Instituto Politécnico Nacional.

- alimentos, en el cancerígeno humano aducto AFB₁-ADN. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas UNAM 16:109-120.
- Carvajal M y Arroyo G. 1997. Management of aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 22:327-350.
- Carvajal M, Berumen J, and Guardado EM. 2012. The presence of aflatoxin B₁-FAPY adduct and human papilloma virus in cervical smears from cancer patients in Mexico. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 29:258-268.
- Cary JW, Rajasekaran K, Brown RL, Luo M, Chen ZY, and Bhatnagar D. 2011. Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxin* 3:678-696.
- Chang PK. 2003. The *Aspergillus parasiticus* protein *afII* interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator *afIR*. *Molecular and General Genetics* 268:711-719.
- Chang PK and Ehrlich KC. 2010. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*?. *International Journal of Food Microbiology* 138:189-199.
- Chang PK, Horn BW, and Dorner JW. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology* 42:914-923.
- Cleveland TE, Yu J, Fedorova N, Bhatnagar D, Payne GA, Nierman WC, and Bennett JW. 2009. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 27:151-157.
- Cotty JW. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79:808-814.
- Cotty PJ and Jaime-García R. 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology* 119:107-115.
- Coursaget N, Depril M, Chabaud R, Nandi V, Mayelo P, and LeCann B. 1993. High prevalence of mutations at codon 249 of the p53 gene in hepatocellular carcinomas. *British Journal of Cancer* 67:1395-1397.
- Criseo G, Racco C, and Romeo O. 2008. High genetic variability in non-aflatoxigenic *A. flavus* strains by using Quadruplex. *International Journal of Food Microbiology* 125:341-343.
- De Luna-López MC, Valdivia-Flores AG, Jaramillo-Juárez F, Reyes JL, Ortiz-Martínez R, and Quezada-Tristán T. 2013. Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin production in immature grains of maize genotypes. *Journal of Food Science and Engineering* 3:688-698.
- Degola F, Berni E, and Restivo FM. 2011. Laboratory test for assessing efficacy of atoxigenic *Aspergillus flavus* strains as biocontrol agents. *International Journal of Food Microbiology* 146:235-243.
- Devreese M, de Backer P, and Croubels S. 2013. Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82:181-190.
- Díaz-Franco A y Montes-García N. 2008. La fitopatología en la región semiárida de Tamaulipas, México: Reseña histórica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 62-70.
- Dorner JW. 2008 Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives & Contaminants* 25:203-208.
- Ehrlich KC and Cotty PJ. 2004. An isolate *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 65:473-478.
- Ehrlich KC, Yu J, and Cotty PJ. 2005. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology* 99:518-527.
- Elias OR, Castellanos NA, Gaytan MM, Figueroa CJD, and Loarca PG. 2002. Comparison of nixtamalization and extrusion process for reduction in aflatoxin content. *Food Additives & Contaminants* 19:878-885.
- El-Nagerabi SAF, Elshafie AE, Alkhanjari SS, Al-Bahry S, and Elamin MR. 2013. Biological activities of *Boswellia sacra* extracts on the growth and aflatoxins secretion of two aflatoxigenic species of *Aspergillus* species. *Food Control* 34:763-769.
- FDA (Food and Drugs Administration). 2012. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm077969.htm (consulta, mayo 2012).
- Fornieles J. 2001. Almacenaje de granos en silos bolsa. Una alternativa, INTA. www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/posco/granos/Fornieles.pdf (consulta, mayo 2012).
- García AG, Martínez FR y Melgarejo HJ. 2003 Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en el estado de Sonora durante el año 1998. Informe Técnico. Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica, Universidad Nacional Autónoma de México 72:187-193.

- García S and Heredia N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia* 162:255-264.
- Gao X, Ma Q, Zhao L, Lei Y, Shan Y, and Ji C. 2011. Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B₁, M₁, and G₁ detoxification. *European Food Research Technology* 232:957-962.
- Georgianna DR and Payne GA. 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology* 46:113-125.
- Georgianna DR, Fedorova ND, Burrohugs JL, Dolezal AL, Bok JW, Horowitz-Brown S, Woloshuk CP, Yu J, Keller NP, and Payne GA. 2010. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Molecular Plant Pathology* 11: 213-226.
- Guzmán-De Peña D. 2007. La exposición a la aflatoxina B₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México* 49:227-235.
- Guzmán ODA, Trudel L, and Wogan GN. 1995. Corn "nixtamalización" and the fate of radiolabelled aflatoxin B₁ in the tortilla making process. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55:85-864.
- Hernández DS, Reyes LA, Reyes MCA, García OJG y Mayek PN. 2007. Incidencia de hongos potencialmente tóxicos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:127-133.
- Hong LS and Yusof NIM. 2010. Determination of aflatoxins B₁ and B₂ in peanut and corn based products. *Sains Malaysiana* 39:731-735.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. 2013. <http://www.iarc.fr/index.php> (consulta, febrero 2013).
- Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT, and Goto T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*. *Mycological Research* 105:233-239.
- Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Muñoz A, and Kensler TW. 2003. Prospective detection of codon 249 mutation in p53 in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis* 10:1657-1663.
- Jaime-García R and Cotty PJ. 2010. Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1842-1847.
- Kebede H, Abbas HK, Fisher DK and Bellaloui N. 2012. Relationship between aflatoxin contamination and physiological responses of corn plants under drought and heat stress. *Toxins* 4:1385-1403.
- Klich MA. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. First edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. 166p.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Li P, Zhang Q, Zhang D, Guan DX, Liu DX, Fang S, Wang X, and Zhang W. 2011. Aflatoxin measurement and analysis. pp. 183-208. *In: Torres-Pacheco I (ed.). Aflatoxins - Detection, Measurement, and Control. Intech. Rijeka, Croatia. 364 p.*
- Lira SRH. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (D. C.), Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:214-221.
- Liu Y and Wu F. 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 118:818-824.
- Madrigal BE, Madrigal SO, Alvarez GI, and Morales GJA. 2011. Aflatoxin B₁ - Prevention of Its Genetic Damage by Means of Chemical Agents. Pp: 251-282. *In: Torres PI. (ed.). Aflatoxins - Detection, Measurement and Control. InTech Europe. 364 p.*
- Magan N and Aldred D. 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119:131-139.
- Magnussen A and Parsi MA. 2013. Aflatoxin, hepatocellular carcinoma and public health. *World Journal of Gastroenterology* 19:1508-1512.
- Martínez FR, García AG y Melgarejo HJ. 2003. Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en Tamaulipas, México, en 1998. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* 74:313-321.
- Marui J, Yamane N, Ohashi-Kunihiro S, Ando T, Terabayashi Y, Sano M, Ohashi S, Ohshima E, Tachibana K, Higa Y, Nishimura M, Koike H, and Machida M. 2011. Kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae* is regulated by a Zn(II)(2)Cis(6) transcriptional activator and induced by kojic acid at the transcriptional level. *Journal of Biosciences and Bioengineering*. 112:40-43.
- Mejía TL, Chapa OAM, Vazquez CMA, Torres PI, and Guevara GRG. 2011. Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology - Biotechnological Approaches for Control in Crops. Pp: 317-354. *In: Torres PI. (ed.). Aflatoxins-Detection, Measurement and Control. InTech Europe. 364 p.*
- Méndez AJA, Arámbula VG, Preciado ORE, and Moreno MM. 2004. Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-based food. *International Journal of Food Microbiology* 94:211-215.
- Montes GN, Reyes MCA, Montes RN, and Cantú AMA. 2009. Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. *Journal of Food* 7:119-125.
- Moreno LS y González SL. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica* 32:193-205.
- Moreno ME y Gil GM. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. Coordinación de la investigación científica. Programa Universitario de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 42p.
- Moreno ME y Vázquez BM. 2000. Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. *Agrociencia* 34:477-484.
- Moudgil V, Redhu D, Dhanda S, and Singh J. 2013. A review

- of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 32:165-175.
- Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, and Tuzun S. 2001. Bacillo-mycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* 90:622-629.
- Nazari ZK, Nakisa A, and Rahbar NF. 2013. The occurrence of aflatoxins in peanuts in supermarkets in Ahvaz, Iran. *Journal of Food Research* 2:94-100.
- Niknejad F, Zaini F, Faramarzi MA, Amini M, Kordbacheh P, Mahmoudi M, and Safara M. 2012. *Candida parapsilosis* as a potent biocontrol agent against growth and aflatoxin production by *Aspergillus* species. *Iranian Journal of Public Health* 41:72-80.
- Nogueira JHC, Gonzalez E, Galleti SR, Facanali R, Marques MOM, and Felicio JD. 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology* 137:55-60.
- Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, productos y servicios. Cereales y sus productos. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias ynutrimientales. d o f . g o b . m x / n o t a _ d e t a l l e . php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009 (consulta, mayo 2012).
- Novas MV and Cabral D. 2002. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus*. *Plant Disease* 86:215-219.
- Ochoa MA, Torres CP, Moreno IG, Yépez GS, Álvarez CR, Marroquín JA, Tequida MM, and Silveira GM. 1989. Incidencia de Aflatoxina B₁ y Zearalenona en trigo y maíz almacenado en el estado de Sonora. *Revista de Ciencias Alimentarias* 1:16-20.
- Ortega PR. 2003. La diversidad del maíz en México. Pp:123-154. *In: Esteva G y C Marielle (eds.). Sin Maíz no hay País. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas México, D. F.*
- Palumbo JD, Baker JL, and Mahoney NE. 2006. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microbial Ecology* 52:45-52.
- Paterson RRM and Lima M. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food Research International* 43:1902-1914.
- Paterson RRM and Lima M. 2011. Further mycotoxins effects from climate change. *Food Research International* 44:2555-2566.
- Payne GA and Yu J. 2010. Ecology, development and gene regulation in *Aspergillus flavus*. *In: Aspergillus: Molecular Biology and Genomics. Machida M, Gomi K (eds.). pp. 157-171. Caister Academic Press. Norwich, United Kingdom. 238 p.*
- Pérez-Flores GC, Moreno-Martínez E, and Méndez-Albore A. 2011. Effect of microwave heating during alkaline-cooking of aflatoxin contaminated maize. *Journal of Food Science* 76:T48-T52.
- Peterson SW, Horn BW, Ito Y, and Goto T. 2000. Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamarii* and *A. caelatus*. pp. 447-458. *In: Samson RA y Pitt JI. (eds.). Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification. Harwood Academic Publishers, Australia.*
- Pitt JI and Hocking AD. 2006. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia* 162:233-243.
- Plasencia J. 2004. Aflatoxins in maize: a Mexican perspective. *Journal of Toxicology* 23:155-177.
- Probst C, Schulthess F, and Cotty PJ. 2010. Impact of *Aspergillus* section Flavi community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *Journal of Applied Microbiology* 108:600-610.
- Probst C, Callicott KA, and Cotty PJ. 2012. Deadly strains of Kenyan *Aspergillus* are distinct from other aflatoxin producers. *European Journal of Plant Pathology* 132:419-429.
- Ramos A y Hernández E. 1997. Adsorción *in vitro* de aflatoxinas mediante la utilización de compuestos adsorbentes: montmorillonita. *Revista Iberoamericana de Micología* 14:7277.
- Reddy KN, Abbas HK, Zablutowickz RM, Abel CA, and Koger CH. 2007. Mycotoxin occurrence and *Aspergillus flavus* soil propagules in a corn and cotton glyphosate-resistant cropping systems. *Food Additives and Contaminants* 24:1367-1373.
- Reglamento Sanitario de los Alimentos. 2012. Artículo 169, decreto 977/96 del Ministerio de Salud de Chile. www.sernac.cl/sernac2011/descargas/leyes/decreto/ds_977-96_reglamento_alimentos.pdf (consulta, mayo 2012).
- Requena F, Saume E y León A. 2005. Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical* 23:393-410.
- Reyes MCA y Cantú AMA. 2003. H-439: Híbrido de maíz de grano blanco para el trópico y subtropico de México. *Campo Experimental Río Bravo, INIFAP. Boletín Informativo Volumen 3, Número 7. Río Bravo, México. 2p.*
- Reyes MCA y Cantú AMA. 2004. H-437, Híbrido de maíz para el noreste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:289-290.
- Reyes MCA y Cantú AMA. 2006. Maíz. Pp. 55-74. *En: LA Rodríguez del Bosque (ed.). Campo Experimental Río Bravo: 50 años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas. Historia, Logros y Retos. Libro Técnico no. 1. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP-SAGARPA. Río Bravo, México. 325 p.*
- Reyes MCA, Cantú AM, Garza CM, Vázquez CG y Córdova OH. 2009. H-443A, Híbrido de maíz de grano amarillo para el noreste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:331-333.
- Reyes VW, Patricio MS, Isaías EVH, Nathal VMA, De Lucas PE y Rojo F. 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM₁ en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Técnica Pecuaria en México* 47:223-230.
- Reyes-Velázquez WP, Isaías-Espinoza VH, Rojo F,

- Jiménez-Plascencia C, de Lucas-Palacios E, Hernández-Góborá J, and Ramírez-Álvarez A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 30:182-185.
- Robledo ML, Marín S y Ramos AJ. 2001. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología* 18:141-144.
- Rocha-Vilela G, de Almeida GS, D'Arce MABR, Moraes MHD, Brito JO, da Silva MFGF, Silva SC, Piedade SMS, Calori-Domingues MA, and da Gloria EM. 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research* 45:108-111.
- Rodríguez BLA. 1996. Impact of agronomic factor on aflatoxin contamination in preharvest field corn in Northeastern México. *Plant Disease* 80:988-993.
- Rodríguez BLA, Cantú AMA, and Reyes MCA. 2010. Effect of planting date and hybrid selection on *Helicoverpa zea* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) damage on maize ears in Northeastern México. *Southwestern Entomologist* 35:157-164.
- Rodríguez BLA, Reyes MCA, Acosta NS, Girón CJR, Garza CI y Villanueva GR. 1995. Control de aflatoxinas en maíz en Tamaulipas. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP. Folleto Técnico No. 17. Río Bravo, México. 20p.
- Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N, and Geisen R. 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 135:231-237.
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2014. Consulta Pública de Solicitudes de OGM. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.senasica.gob.mx (consulta, enero, 2014)
- Sharma M and Márquez C. 2001. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology* 93:109-114.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. Estadísticas de Producción para el Año Agrícola 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.siap.gob.mx/index (consulta, enero, 2014).
- Soini Y, Chia SC, Bennet WP, Groopman JD, Wang JS, and De Benedetti VMG. 1996 An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from México. *Carcinogenesis* 17:1007-1012.
- Stojanovska-Dimzoska B, Hajrulani-Muslin Z, Dimitrieska-Stojkovic E, Uzunov R, and Sekulovski P. 2013. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products determined by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Natural Sciences Matica Srpska Novi Sad* 124:27-35.
- Suárez EFC, Vargas GMJ, López CC, and Moreno J. 2007. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection* 26:26-53.
- Tapia-Salazar M, García-Pérez OD, Nieto-López M, Ricque-Marie D, Villarreal-Cavazos y Cruz-Suárez LE, 2010. Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. En: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos D, Gamboa-Delgado J (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. Monterrey, México. pp. 514-546.
- Taylor WJ and Draughon FA. 2001. *Nannocystis exedens*: A potential biocompetitive agent against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection* 64: 1030-1034.
- Tejada-Castañeda ZI, Ávila-González E, Casaubón-Huguenin MT, Cervantes-Olivares RA, Vásquez-Peláez C, Hernández-Baumgarten EM, and Moreno-Martínez E. 2008. Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poultry Science* 87:1569-1576.
- Tequida MM, Cortez RM, Rosas BEC, López SS y Corrales MC. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología* 19:84-88.
- Thompson DP. 1992. Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia* 84:791-793.
- Torres EE, Acuña AK, Naccha TL, and Castellon SJP. 1995. Quantification of aflatoxins in corn distributed in the city of Monterrey, Mexico. *Food Additives and Contaminants* 12:383-386.
- Torres PI, Guzmán OM, and Ramírez WB. 2001. Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2825-2829.
- Umemura M, Koike H, Nagano N, Ishii T, Kawano J, Yamane N, Kozono I, Horimoto K, Shin-ya K, Asai K, Yu J, Bennett JW, and Machida M. 2013. MIDDAS-M: motif independent de novo detection of secondary metabolite gene clusters through the integration of genome sequencing and transcriptome data. *PlosONE* 8:e84028.
- Unión Europea EFSA. 2002. Directiva de la Comisión del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal no. 2002/32/EC eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:285:0033:0037:ES:PDF (consulta, mayo 2012).
- Wild CP and Gong YY. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31:71-82.

- Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, and Kuca K. 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews* 41:1-7.
- Yin YN, Yan LY, Jiang JH, and Ma ZH. 2008. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science B* 9:787-792.
- Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, and Bennett JW. 2009. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1253-1262.
- Zhao LH, Guan S, Gao X, Ma QG, Lei YP, Bai XM, and Ji C. 2010. Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *Journal of Applied Microbiology* 110:147-155.